UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
AUG 31 '60

EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

K. v. Frisch, M. Lindauer und K. Daumer: Über die Wahrnehmung polarisierten Lichtes durch das Bienenauge 289

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

P. Da Re and L. Verlichi: A New Synthesis of 3-Substituted Chromanones 301

N. Neuss and Nancy J. Cone: Alkaloids of Apocynaceae V. Hunterine, a New Alkaloid from *Hunteria eburnea* Pichon . 302

Ruth Lotmar: Der Einbau von ^{35}S in die Kostalknorpel von Meerschweinchen unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide 303

F. Šorm, J. Škoda, and J. Kára: Antagonism between 5-Azauracil and Pyrimidine Precursors of Ribonucleic Acids in *Escherichia coli* 304

E. Aschheim: Adsorption and Active Transport 305

H. Stähelin: Über die Beeinträchtigung der Wirkung von Spindelgiften in der Zellkultur durch menschliches Serum sowie durch Seren verschiedener Tierspezies 306

A. Bolognari: Precisazioni sul Nucleolonema 307

Ch. Toussaint and P. Vereerstraeten: Renal Tubular Transport of Sodium During Sodium Chloride and Sodium Bicarbonate Loadings in the Normal Dog 309

N. C. Pant, P. Gupta, and J. K. Nayar: Physiology of Intracellular Symbiotes of Stegobium paniceum L. with Special Reference to Amino Acid Requirements of the Host . . . 311

F. N. Ghadially: Some Etiological Factors in the Production of Malignant Melanoma 312

E. Dodt and V. Elenius: Change of Threshold During Dark Adaption Measured with Orange and Blue Light in Cats and Rabbits 313

M. Libonati and G. Segre: pH-Dependant Action of NaCl on Isolated Guinea Pig's Ileum 314

B. Schär und R. Meier: Hemmung der durch Proteuslipopolysaccharide gesteigerten Leukozytenemigration in vitro durch antiinflammatorische Corticosteroide 315

J. R. Pasqualini, R. Zelnik et M. F. Jayle: Séparation par chromatographie sur papier des 21 sulfates de corticosteroïdes 317

L. C. Mokrasch: On the Thermogenic System of Hibernants. 318

H. Tiedemann und H. J. Risse: Über die Wirkung von Phenanthrenchinon (9,10) und einer wasserlöslichen Transportform auf Glykolyse und Atmung des Ascites-Tumor 319

R. R-Candela: Effect of the Glucagon on the Plasma Insulin-Activity after Hypophysectomy 320

M. Piller: Beeinflussung der Bromsulphalein-Clearance durch Sulfonamide beim Kaninchen 321

W. C. Quevedo, Jr. and J. E. Isherwood: Antioxidant Activity of Mouse Liver and Kidney Extracts 323

L.-G. Allgén, B. Jönsson, B. Nauckhoff, M.-L. Andersen, I. Huus, and I. Møller Nielsen: On the Elimination of Chlorprothixene in Rat and Man 325

R. A. Boissonnas, St. Guttmann, P.-A. Jaquenoud, H. Konzett, and E. Stürmer: Synthesis and Biological Activity of Peptides Related to Bradykinin 326

P. Hník: Muscle Atrophy Following Section of the Spinal Cord in the Rat 326

L. Å. Hanson, V. Raunio, and C. Wadsworth: A Method of Determining Electrophoretic Mobilities and Antibodies (Pro Experimentis) 327

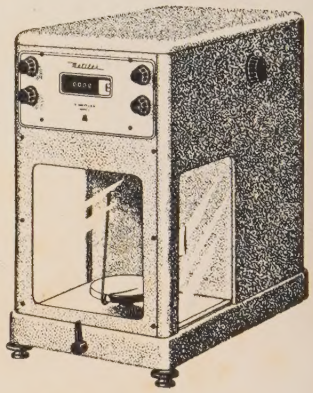
G. K. Roussev: Methods of Obtaining and Mode of Action of Stage Ontogenins (Studiorum Progressus) 329

C. D. Nenitzescu: Eine neue Umlagerung der Phenylalkane und ihre Beziehung zur Friedel-Crafts-Reaktion (Studiorum Progressus) 332

Congressus. 336

E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich

Garantierte
Genauigkeit
Konstante
Empfindlichkeit
Bessere
Reproduzierbarkeit



A 2

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XVI/7

Ciba AG., Basel
Ganz Optar AG, Zürich
J. R. Geigy A.G., Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel
E. Mettler, Zürich
Regis Chemical Company, Chicago, Ill.
Sandoz A.G., Basel
Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 68.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 68.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e puo esser richiesta ad ogn libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 68.–. Il prezzo vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is fr. 68.–. Price in Swisscurrency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1959 Birkhäuser Verlag, Basel 10 Schweiz, Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

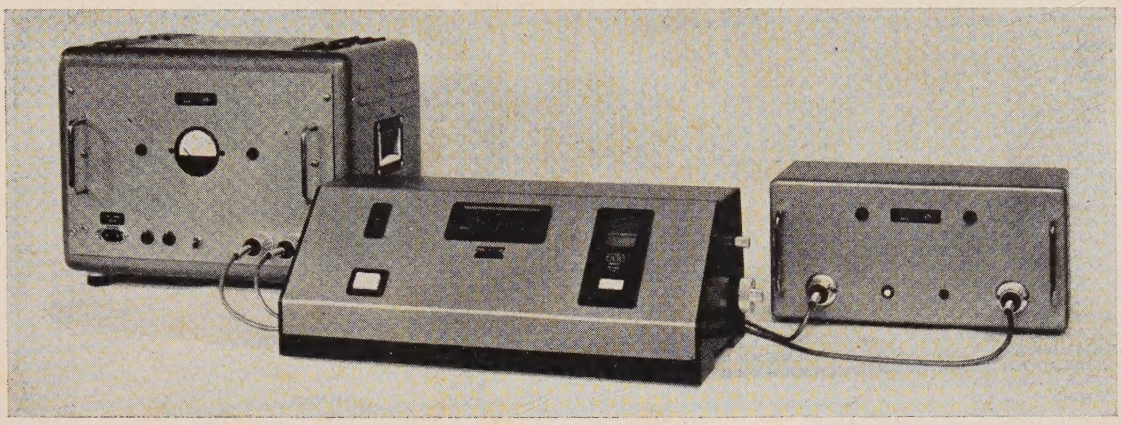
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS

Lichtelektrisches Präzisionspolarimeter 0,005°

Besondere Merkmale:

- Hohe Meßgenauigkeit
- Frei von persönlichen Einstellfehlern und frei von Parallaxe
- Ermüdungsfreie Reihenmessung und denkbar einfache Bedienung
- Automatische Empfindlichkeitsregelung



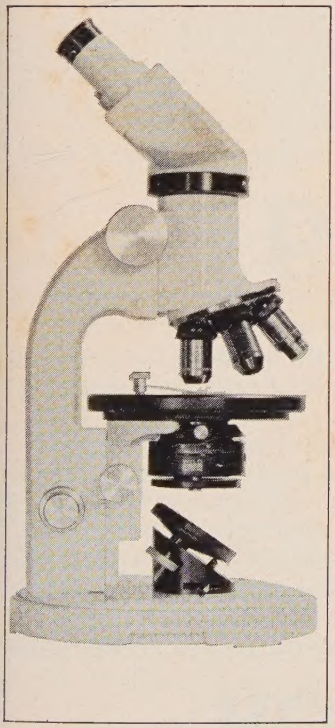
Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50–381/C

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ *Optar* AG
ZÜRICH
Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 25 16 75



Wild M 11

Das neuartige, ausbaufähige Mikroskop

Ideal für Kurse und Laboratorien, für Studenten der Medizin und der Naturwissenschaften. Die Grundausrüstung lässt sich später nach dem «Baukastenprinzip» mit wenigen Handgriffen bis zum Forschungsstativ ausbauen.

✪ Schweizer Präzisionsinstrument. Ausgerüstet mit der ausgezeichneten Wild-Mikro-Optik. Neuartige Verpackung in einer Metallhaube.

Prospekt mit technischen Daten durch die Optischen Werke Wild Heerbrugg AG., Heerbrugg/SG

WILD
HEERBRUGG

Volle Garantie für prompten Service und zuverlässige Nachlieferung von Ersatzteilen durch ✪ Schweizer Unternehmen von Weltruf

*

Am Anfang jedes chemischen Produktes steht die Forschung, und zwar

gezielte Forschung

Zufallstreffer sind selten geworden. Ein gut aufeinander abgestimmtes Räderwerk, in dem jeder Forscher Teilaufgaben löst, die näher und näher zum Ziel führen, bis eines Tages der Wurf gelingt, ist heute der einzig gangbare Weg. In den Geigy-Laboratorien führen Hunderte von qualifizierten Mitarbeitern jährlich Zehntausende von Versuchen durch. Dieser hohe Einsatz in gezielter Forschung bürgt dafür, daß Geigy auch in Zukunft bei Verbrauchern in der ganzen Welt auf Vertrauen zählen darf.

Geigy

J.R. Geigy A.G., Basel

A 7

EXPERIENTIA

Vol. XVI – Fasc. 7 Pag. 289–336 15. VII. 1960

Über die Wahrnehmung polarisierten Lichtes durch das Bienenauge*

Von K. v. Frisch, M. Lindauer und K. Daumer**

I. Nachweis und Verbreitung einer Orientierung nach polarisiertem Licht. – II. Das Facettenauge als Analysator für polarisiertes Licht. – III. Widersprechende Ansichten. – IV. Neue Versuche zur Wahrnehmung der Schwingungsrichtung polarisierten Lichtes durch das Bienenauge.

I. Nachweis und Verbreitung einer Orientierung nach polarisiertem Licht

Im Schwänzeltanz zeigen die Bienen ihren Kameraden durch die geradlinige Laufstrecke der Tanzfigur (durch den «*Schwänzellauf*») die Richtung nach einer Futterquelle oder nach einer Niststätte. Als Bezugspunkt für diese Richtungsangabe dient die Sonne. Auf der vertikalen Wabenfläche im Inneren des Bienenstockes wird der Sonnenwinkel (= Winkel zwischen Azimut der Sonne und Azimut des Zieles) den Stockgenossen als Winkel zur Lotlinie demonstriert. Das Transponieren auf das Sinnesgebiet der Schwere-Empfindung ermöglicht die Verständigung im Finsteren. Am Licht und auf waagerechtem Boden, zum Beispiel vor dem Flugloch oder, wie bei den folgenden Versuchen, auf der Wabenfläche eines horizontal gelegten Beobachtungsstockes, hält die Biene beim Schwänzellauf den gleichen Winkel zur Sonne ein wie zuvor beim Flug vom Stock zum Futterplatz und weist so direkt nach dem Ziel.

Wenn man die horizontale Wabe so abschirmt, dass die Bienen keinen Himmel sehen, so tanzen sie desorientiert; die Schwänzelläufe zeigen wechselnd nach allen möglichen Richtungen. Gibt man den Blick nach der Sonne frei, so tanzen sie sofort richtig. Sie zeigen aber auch dann genau nach dem Ziel, wenn man ihnen nur ein kleines Fleckchen blauen Himmels sichtbar macht (Abb. 1). Daraus war zu schliessen, dass sie sich nach der Schwingungsrichtung des linear polarisierten blauen Himmelslichtes orientieren können, die ja vom Sonnenstand abhängig ist[1].

Diese Vermutung liess sich durch weitere Versuche beweisen: Die Anordnung war entsprechend Abbildung 1, doch wurde den Bienen ein erweitertes Blickfeld zu blauem Himmel freigegeben, mit einem Sehwinkel von etwa 40° in der Breite und 30° in der Höhe. Über den Tänzerinnen befand sich eine drehbare Polarisationsfolie. Wurde diese so eingestellt, dass die Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes am sichtbaren Himmelsbereich unverändert blieb, so zeigten die Tänze richtig nach dem Ziel. Durch Drehung der Folie nach rechts oder links wurden sie nach rechts bzw. links um einen entsprechenden Winkel abgelenkt. Wurde den Bienen am sichtbaren Himmelsfleck durch die Folie eine Schwingungsrichtung vorgetäuscht, die zur Zeit an einer *anderen* Himmelsstelle verwirklicht war, so zeigten sie mit Präzision nach einer falschen Richtung, denn sie hielten genau den Tanzwinkel ein, der für jene andere Himmelsstelle richtig gewesen wäre. Wurde

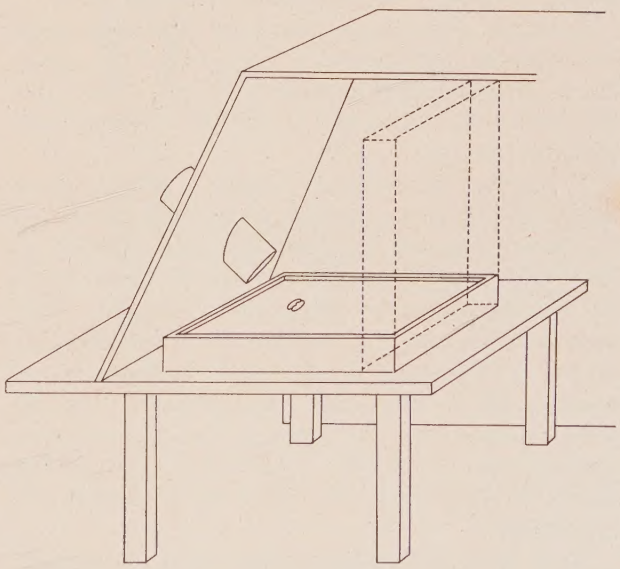


Abb. 1. Beobachtungs-Bienenstock, horizontal gelegt (normale Stellung punktiert eingetragen). Der Stock ist nach allen Seiten abgeschirmt. Wenn die Biene von ihrem Tanzplatz (im Bilde angedeutet) durch das eingesetzte Rohr blauen Himmel sieht, tanzt sie richtig

* Mit Unterstützung der Rockefeller Foundation.

** Zoologisches Institut der Universität München.

[1] K. v. Frisch, Naturwissenschaften *35*, 12, 38 (1948).

durch die Folienstellung eine Schwingungsrichtung gezeigt, die zur Zeit am Himmel nirgends verwirklicht war, so tanzten die Bienen desorientiert. Wurde den Tänzerinnen ein Polarisationsmuster gezeigt, das an *zwei* einander gegenüberliegenden Stellen des Himmels gegeben war, so wiesen sie abwechselnd nach zwei spiegelbildlichen Richtungen, zwischen denen sie – ohne die Hilfe von Landmarken – keine Unterscheidung treffen konnten[2,3].

Auch beim freien Flug steuern die Bienen nach der Sonne und dem polarisierten Himmelslicht. Sie tun es nicht nur kurzfristig, um geradlinig zu fliegen, sondern sie können zu jeder Stunde eine bestimmte, gedächtnismässig bekannte Kompassrichtung einschlagen, indem sie die Tageszeit berücksichtigen und den Lauf der Sonne einrechnen. Wie bei den Tänzen kann die Sonne durch den Anblick des blauen Himmels ersetzt werden. Bei einer Richtungsdressur im Schatten eines Bergrückens war für die sammelnden Bienen *nur* blauer Himmel sichtbar. Trotzdem gaben sie nach der Heimkehr bei ihren Tänzen auf der vertikalen Wabe die Richtung nach dem Ziel an. Als der Stock am folgenden Tag in einer weit entfernten fremden Landschaft aufgestellt wurde, flogen sie in der andressierten Kompassrichtung[4].

Seit für Bienen der Nachweis für eine Orientierung nach polarisiertem Licht erbracht war[2], wurde eine solche auch bei zahlreichen anderen Arthropoden festgestellt[5]. Das gilt für folgende Formen:

1. *Spinnentiere:* Trichterspinne, *Agelena*[6]; Uferspinne, *Arctosa*[7–9]; Wassermilben, *Hydracarina*[10].

2. *Krebse:* Phyllopoda: *Daphnia*[11], *Daphnia, Sida, Simocephalus, Leptodora* u. a. Cladoceren[10,12]. – Anostraca: *Artemia* (Stockhammer[13], S. 32). – Mysidacea: *Mysidium*[14,12]. – Isopoda: *Tylos*[15,16]. – Amphipoda: *Talitrus*[17–20].

3. *Insekten:* Rhynchota: *Velia*[21]. – Hymenoptera: Neben der Honigbiene andere *Apis*arten[22], die stachellose Biene *Trigona*[23], die solitären Bienen *Andrena* und *Halictus*[23], ferner *Bombus* und *Vespa*[23], Ameisenarten der Gattung *Lasius*[24,25], *Myrmica*[26,27], *Formica, Tetramorium, Tapinoma*[28], *Camponotus*[23], *Neodiprion*-Larven[29]. – Coleoptera: Scarabaeidae: *Geotrupus*[30] und *Melolontha*[31–33]. Carabidae: *Dyschirius*[34]. Tenebrionidae: *Phaleria*[35]. – Trichoptera: *Neureclipsis*-Larven (Stockhammer[13], S. 33). – Lepidoptera: verschiedene Schmetterlingsraupen[29,36]. – Diptera: *Drosophila*[37,38]; *Sarcophaga*[39].

Diese Fälle sind untereinander nicht gleichwertig. Die Orientierung kann von zweierlei Art sein:

1. Ähnliche Leistungen wie bei Bienen wurden von Pardi und Papi[17,18] für das Krebschen *Talitrus* nachgewiesen. Es lebt in der Gezeitenzone des Meeres. Wenn es landeinwärts oder auf das Wasser hinaus vertragen wird, schlägt es die Kompassrichtung zur Küste ein, wobei es sich nach dem Sonnenstand oder, bei verdeckter Sonne, nach dem polarisierten Licht orientiert. Die Fähigkeit, vermittels einer inneren Uhr und unter Einrechnung des Sonnenlaufes eine biologisch bedeutsame Kompassrichtung nach dem polarisierten Himmelslicht zu steuern, ist auch erwiesen für die Landassel *Tylos latreillii*[15,16], für die Wolfsspinne *Arctosa perita*[7–9], für verschiedene Käfer (*Dyschirius*[34], *Phaleria*[35]), für die Waldameise *Formica*[28]. Bei anderen Ameisen, beim Mistkäfer und bei der Trichterspinne ist ein Einkalkulieren der Tageszeit bisher nicht erwiesen, wohl aber das Einhalten einer geraden Richtung oder das Finden des Rückweges kurz nach dem Hinweg mit Hilfe des polarisierten Lichtes: *Lasius*[24,25], *Geotrupes*[30], *Agelena*[6]. Gemeinsam ist allen diesen Fäl-

[2] K. v. Frisch, Exper. *5*, 142 (1949).
[3] K. v. Frisch, Exper. *6*, 210 (1950).
[4] K. v. Frisch und M. Lindauer, Naturwissenschaften *41*, 245 (1954).
[5] Verkhovskaya fand schon 1940 (Bull. Soc. Natural. Moscou, S. Biol. [N. S.] *49*, 101), dass *Daphnia* und *Drosophila* in positiv phototaktischer Stimmung ein Strahlenbündel von polarisiertem Licht merklich stärker aufsuchen als ein solches von nicht polarisiertem Licht und gleicher Intensität. Eine Fähigkeit, die Schwingungsrichtung polarisierten Lichtes zu analysieren, war durch diese Versuche nicht erwiesen und auch von der Verfasserin nicht behauptet worden.
[6] P. Görner, Z. vergl. Physiol. *41*, 111 (1958).
[7] F. Papi, Z. vergl. Physiol. *37*, 230 (1955).
[8] F. Papi, Z. vergl. Physiol. *41*, 481 (1959).
[9] F. Papi, L. Seretti und S. Parrini, Z. vergl. Physiol. *39*, 531 (1957).
[10] E. R. Baylor und F. Smith, Amer. Naturalist *87*, 97 (1953).
[11] B. Eckert, Československa Biol. *2*, 76 (1953).
[12] T. H. Waterman, Z. vergl. Physiol. *43*, 149 (1960).
[13] K. Stockhammer, Ergebn. Biol. *21*, 23 (1959).
[14] R. Bainbridge und T. H. Waterman, J. exp. Biol. *34*, 342 (1957).
[15] L. Pardi, Boll. Istit. Museo zool. Univ. Torino *4*, No. 11 (1953/54).
[16] L. Pardi, Z. Tierpsych. *11*, 175 (1954).
[17] L. Pardi und F. Papi, Naturwissenschaften *39*, 262 (1952).
[18] L. Pardi und F. Papi, Z. vergl. Physiol. *35*, 459 (1953).
[19] F. Papi und L. Pardi, Z. vergl. Physiol. *35*, 490 (1953).
[20] L. Pardi und M. Grassi, Exper. *11*, 202 (1955).
[21] G. Birukow, Z. Tierpsychol. *13*, 463 (1956).
[22] M. Lindauer, Z. vergl. Physiol. *38*, 521 (1956).
[23] Una F. Jacobs-Jessen, Z. vergl. Physiol. *41*, 597 (1959).
[24] Ilse Schifferer in v. Frisch[3], S. 220.
[25] J. D. Carthy, Behaviour *3*, 275, 304 (1951).
[26] D. M. Vowles, Nature *165*, 282 (1950).
[27] D. M. Vowles, J. exp. Biol. *31*, 341 (1954).
[28] R. Jander, Z. vergl. Physiol. *40*, 162 (1957).
[29] W. G. Wellington, C. R. Sullivan und G. W. Green, Canad. J. Zool. *29*, 330 (1951).
[30] G. Birukow, Naturwissenschaften *40*, 611 (1953).
[31] A. Couturier und P. Robert, C. R. Acad. Sci., Paris *242*, 3121 (1956).
[32] A. Couturier und P. Robert, Bull. Soc. Hist. nat., Colmar *47*, [4e sér.] 4, 27 (1956).
[33] A. Couturier und P. Robert, C. R. Acad. Sci., Paris *245*, 2399 (1957).
[34] F. Papi, Atti Soc. toscana Sci. nat. Pisa Mem. *62 B*, 83 (1955).
[35] L. Pardi, Boll. Istit. Museo zool. Univ. Torino *5*, Nr. 1 (1955/56).
[36] W. G. Wellington, C. R. Sullivan und W. R. Henson, Canad. Ent. *86*, 529 (1954).
[37] G. C. Stephens, M. Fingerman und F. A. Brown, Anat. Rec. *113*, 559 (1952).
[38] G. C. Stephens, M. Fingerman und F. A. Brown, Ann. ent. Soc. Amer. *46*, 75 (1953).
[39] W. G. Wellington, Nature *172*, 1177 (1953).

len das Vermögen, sich *auf Grund von Erfahrung und Gedächtnis auf einen beliebigen Winkel zur Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes auf wenige Grade genau einzustellen* (*menotaktische Orientierung nach polarisiertem Licht*).

2. Auf einer *primitiveren Stufe* steht das Verhalten von *Daphnia*[11] und anderen Cladoceren[10], *Mysidium*[14], *Wassermilben*[10], *Drosophila*[37,38], manchen *Hymenopteren*[23]. Diese Tiere stellen sich in einem *konstanten Winkel zur Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes* ein, meist senkrecht zu ihr, manchmal auch parallel zu ihr oder diagonal unter 45°. Solche Orientierungsweise entspricht der einfachen phototaktischen Einstellung zu einer Lichtquelle (*Tropotaxis*).

Die beiden Orientierungsweisen schliessen sich nicht gegenseitig aus. BIRUKOW[30] erwähnt beim Mistkäfer alle beide. JACOBS-JESSEN[23] konnte nachweisen, dass bei der Honigbiene und bei der Waldameise statt der schon lange bekannten menotaktischen Orientierung unter gewissen Bedingungen eine Einstellung in konstantem Winkel zur Schwingungsrichtung vorkommt, wobei letztere auch ohne jede vorangegangene Erfahrung auftritt, also *angeboren* ist.

II. Das Facettenauge als Analysator für polarisiertes Licht

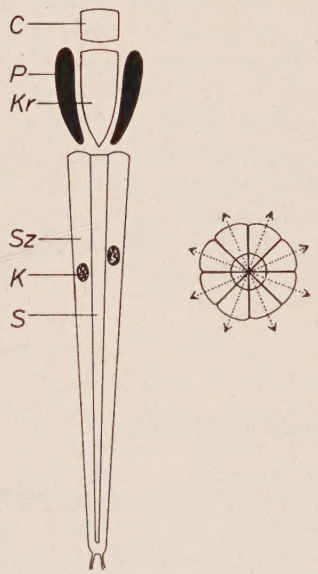
AUTRUM sprach als erster die Hypothese aus, dass die Analyse des polarisierten Lichtes *in den Sinneszellen* des Facettenauges erfolgt. Auf dem Querschnitt durch ein Einzelauge sind sie sternförmig um seine Längsachse angeordnet (vgl. Abb. 2). Wenn sie das durchtretende Licht polarisieren, und zwar – ihrer Stellung entsprechend – mit verschiedener Schwingungsrichtung, sollten sie als Radiäranalysator wirken. Die Annahme wurde durch *elektrophysiologische Versuche* an Fliegen- und Bienenaugen gestützt[40]:

Die Höhe der durch Lichtblitze ausgelösten Potentiale ist von der Lichtintensität abhängig. Drehung eines vorgeschalteten Polarisationsfilters hatte keinen Einfluss auf die Höhe der Belichtungspotentiale. Daraus folgt, dass den Sinneszellen eines Ommatidiums kein gemeinsamer Polarisator (Cornea, Kristallkegel) vorgeschaltet ist. Doch liess sich zeigen, dass polarisiertes Licht einen stärkeren Effekt hat als unpolarisiertes Licht von gleicher Intensität. Diese Erscheinung wird verständlich, wenn die Sinneszellen das Licht, das sie in ihrer Längsrichtung durchsetzt, polarisieren (Abb. 2). Wenn dann die Schwingungsrichtung von einfallendem polarisiertem Licht in einer Sinneszelle mit deren eigener Schwingungsrichtung übereinstimmt, muss ein grösserer Helligkeitseffekt entstehen als durch unpolarisiertes Licht gleicher Intensität. Dass dafür die anders orientierten Sinneszellen geringere Potentiale ergeben, ist belanglos, weil für den Gesanteffekt jeweils das grösste Potential massgebend ist.

Nach dieser Theorie entsteht durch polarisiertes Licht in jedem Ommatidium ein Helligkeitsmuster, dessen Verteilung auf die Sinneszellen von der Schwingungsrichtung und dessen Kontrastreichtum vom Polarisationsgrad abhängt. Da die Sinneszellen durch getrennte Nervenfasern abgeleitet werden, ist die Voraussetzung für eine zentrale Auswertung gegeben.

BAYLOR und KENNEDY[41] haben – ohne nähere Angaben über ihre Methode – widersprechende Befunde mitgeteilt. AUTRUM vermutet, dass sie gewisse Fehlerquellen nicht beachtet haben (mündliche Mitteilung). Er wird an anderer Stelle darauf eingehen. LÜDTKE[42] konnte die Angaben von AUTRUM und STUMPF mit kritischer Methode für das Bienenauge bestätigen. Bei *Notonecta* fand er Abweichungen, die offensichtlich mit der anderen Stellung der Sinneszellen in den Ommatidien dieser Augen zusammenhängen.

Auf einem anderen Wege kam auch STOCKHAMMER[43,13] zu der Überzeugung, dass der Analysator für polarisiertes Licht in den Sinneszellen lokalisiert ist. Seine *polarisationsoptischen Untersuchungen* beweisen, dass im dioptrischen Apparat (Cornea und Kristallkegel) der Facettenaugen von Insekten kein Analysator vorhanden ist[44]. Die Sehstäbchen der Sinneszellen fand er in der natürlichen Durchgangsrichtung des Lichtes stets doppelbrechend (vgl. auch S. 293). Messungen der Schwingungsrichtungen an zahlreichen Fliegenaugen ergaben in bester Übereinstimmung mit AUTRUMS Theorie eine Abhängigkeit von der Stellung der Sinneszellen, wie sie in Abbildung 2 für die Strahlen mit kleinerer Brechzahl schematisch dargestellt ist.



C = Cornealinse
Kr = Kristallkegel
P = Pigmentzelle
Sz = Sinneszelle
K = Zellkern
S = Sehstäbchen

Im Querschnittsbild ist durch die Pfeile die Schwingungsrichtung der Strahlen mit kleinerer Brechzahl für die einzelnen Sinneszellen eingetragen (Schema)

Abb. 2. Facettenauge: *Links* Längsschnitt durch ein Einzelauge, *rechts* Querschnitt durch die Gruppe seiner Sinneszellen

[40] H. AUTRUM und H. STUMPF, Z. Naturf. *5b*, 116 (1950).
[41] E. R. BAYLOR und D. KENNEDY, Anat. Rec. *132*, 411 (1958).
[42] H. LÜDTKE, Z. vergl. Physiol. *40*, 329 (1957).
[43] K. STÖCKHAMMER, Z. vergl. Physiol. *38*, 30 (1956).
[44] Zu dem gleichen Ergebnis kam VOWLES[27] (Teil II, S. 371) bei seinen Untersuchungen an Ameisen.

Damit die Doppelbrechung in den Sehstäben zu einer Analyse des polarisierten Lichtes führt, muss entweder einer der beiden Strahlen (durch Brechung oder Reflexion) eliminiert werden (Nikol-Prinzip) oder einer der beiden Strahlen vom Sehstoff stärker absorbiert werden als der andere (dichroitische Absorption). Was in den Sinneszellen der Facettenaugen geschieht, konnte bisher nicht einwandfrei beobachtet werden. Menzer und Stockhammer[45] entwickelten eine Theorie, nach welcher jedes Sehstäbchen ähnlich wie ein Nikolsches Prisma wirken würde. Auf Grund eingehenderer Untersuchungen ist aber Stockhammer[43] von dieser Annahme wieder abgekommen[46]. Wahrscheinlicher ist, dass die Analyse der Schwingungsrichtung durch den in den Sehstäbchen eingelagerten *Sehstoff* infolge *dichroitischer Absorption* erfolgt[47,13]. Wenn eine solche bisher nicht deutlich nachzuweisen war[47], so könnte doch nach de Vries und Kuiper[48] schon ein sehr geringfügiger Effekt, der mit den bisher angewandten Mitteln nicht nachweisbar ist, physiologisch wirksam sein. Überdies ist zu bedenken, dass sich die Untersuchungen bisher auf den Bereich des sichtbaren Lichtes beschränkt haben; Bienen sind aber für Ultraviolett sehr empfindlich[49], und sie richten sich bei der Orientierung am blauen Himmel nur nach den kurzwelligen Strahlen[50].

Die Vorstellung, dass die Rosette der Sehstäbchen im Ommatidium eine radiär ausgerichtete Polarisation des Lichtes bewirkt und so zum Analysator für die Schwingungsrichtung von einfallendem polarisiertem Licht wird, erhielt in den letzten Jahren eine weitere kräftige Stütze durch *elektronenmikroskopische Untersuchungen*. Es liessen sich in den Sehstäbchen der Facettenaugen streng geordnete Feinstrukturen nachweisen, deren Orientierung in den einzelnen Sinneszellen jeweils ihrer radiären Stellung entspricht. Die Annahme liegt sehr nahe, dass sie die morphologische Grundlage bilden für eine geordnete Einlagerung der Sehstoffmoleküle und hiermit für eine dichroitische Absorption ([13], S. 51, [51–55]).

III. Widersprechende Ansichten

Obwohl die elektrophysiologischen, polarisationsoptischen und zytologischen Ergebnisse in bester Harmonie darauf hinweisen, dass der gesuchte Analysator für polarisiertes Licht in den Sehstäbchen der Ommatidien liegt, wird dies von verschiedenen Seiten bezweifelt. Die widersprechenden Meinungen sind im wesentlichen von zweierlei Art.

1. Der Analysator sei nicht in den Sinneszellen, sondern *im dioptrischen Apparat* gegeben. Waterman[56] fand solches bei *Limulus*, aber nur für schräg einfallendes Licht. Die Erklärung ist vermutlich in den monströsen Fortsätzen der Corneafacetten dieser sonderbaren Augen zu suchen (vgl. Stockhammer[13], S. 48). Da bei *Limulus* keine Reaktionen auf polarisiertes Licht bekannt sind, kann der Fall hier ausser Betracht bleiben. Stephens, Fingerman und Brown[37,38], Berger und Segal[57] und Baylor und Smith[10] vermuten auf Grund theoretischer Überlegungen, dass die spontane Einstellung zur Schwingungsrichtung polarisierten Lichtes bei Krebschen und bei *Drosophila* (vgl. S. 291) durch das dioptrische System zustande komme. Nach Stockhammer ([13], S. 45, 48) ist diese Annahme bei Insekten, deren Augenoptik eingehend untersucht ist, unzutreffend und auch bei anderen Arthropoden, wie Wassermilben und Cladoceren, unwahrscheinlich und durch nichts begründet.

2. Die Reaktionen auf polarisiertes Licht seien nicht auf eine Analyse der Schwingungsrichtung durch das Auge, sondern auf ein *Helligkeitsmuster der Umgebung* zurückzuführen, das seinerseits durch das polarisierte Licht hervorgerufen wird. Die Tiere würden sich zu diesem Helligkeitsmuster phototaktisch einstellen.

Die Ansicht wurde durch Bainbridge und Waterman[58] für einen Wasserbewohner, das Krebschen *Mysidium*, durch die Beobachtung begründet, dass eine spontane Einstellung in bestimmtem Winkel zur Schwingungsrichtung nur in *trübem* Wasser mit Sicherheit festzustellen sei, wobei durch Streuung des von oben einfallenden polarisierten Lichtes ein Helligkeitsmuster entstehe. Nachdem Waterman[12] mit verbesserter Methodik zeigen konnte, dass sich Mysideen und besonders gut Daphnien auch in *klarem* Wasser gerichtet einstellen, wirkt diese Auffassung als alleinige Erklärung der Reaktion nicht mehr überzeugend.

Baylor und Smith[59] und Baylor[60] sind der Meinung, dass man auch für Bienen auf die Annahme eines

[45] G. Menzer und K. Stockhammer, Naturwissenschaften *38*, 190 (1951).

[46] Nach de Vries und Kuiper[48] (S. 199) soll Stockhammer in seiner späteren Arbeit [43] diese Theorie nicht mehr erwähnt haben. Das ist nicht richtig. Man findet bei ihm S. 67 klar ausgesprochen, dass und warum die frühere Ansicht von ihm nicht aufrecht erhalten wird.

[47] Hl. de Vries, A. Spoor und R. Jielof, Physica, Amsterdam *19*, 419 (1953).

[48] Hl. de Vries und J. W. Kuiper, Ann. N. Y. Acad. Sci. *74*, 196 (1958).

[49] K. Daumer, Z. vergl. Physiol. *38*, 413 (1956).

[50] K. v. Frisch, Sitz.-Ber. Bayer. Ak. Wiss. math. nat. Kl. f. 1953, p. 197, München (1954).

[51] H. Fernandez-Moran, Nature *177*, 742 (1956).

[52] H. Fernandez-Moran, Exp. Cell. Res., Suppl. *5*, 586 (1958).

[53] T. H. Goldsmith und D. E. Philpott, J. biophys. biochem. Cytol. *3*, 429 (1957).

[54] J. J. Wolken, J. Capenos und A. Turano, J. biophys. biochem. Cytol. *3*, 441 (1957).

[55] R. Danneel und B. Zeutzschel Z. Naturf. *12b*, 580 (1957).

[56] T. H. Waterman, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. *40*, 258 (1954).

[57] P. Berger und M. J. Segal, C. R. Acad. Sci., Paris *234*, 1308 (1952).

[58] R. Bainbridge und T. H. Waterman, J. exp. Biol. *35*, 487 (1958).

[59] E. R. Baylor und F. E. Smith, Anat. Rec. *132*, 411 (1958).

[60] E. R. Baylor, J. exp. Biol. *36*, 369 (1959).

Analysators im Auge verzichten könne und dass ihre Orientierung nach der Schwingungsrichtung polarisierten Lichtes auf ein durch dieses bewirktes Helligkeitsmuster des Untergrundes zurückgeführt werden könnte; DE VRIES und KUIPER[48] schliessen sich dieser Auffassung an; KALMUS[61] vertritt für die orientierten Tänze bei unseren Versuchen unter blauem Himmel die gleiche Meinung. Sie stützt sich auf folgende Versuche:

KALMUS[61] setzte ein Insekt (z. B. *Drosophila*) in ein Uhrschälchen mit schwarzem Boden und beleuchtete es von oben durch eine Folie mit polarisiertem Licht. Die Anordnung war durch einen schwarzen Zylinder seitlich abgeschirmt. Die Tiere beantworteten eine Drehung des Polaroids mit entsprechenden optomotorischen Reaktionen. Auf *hellem* Untergrund waren die Reaktionen schwach oder sie blieben ganz aus. Für das menschliche Auge ist unter solchen Bedingungen bei Betrachtung schräg von seitlich oben auf dem schwarzen Grund – aber *nicht auf hellem Untergrund* – ein Reflexionsmuster deutlich erkennbar: in der Ebene, die durch die Einfallsrichtung des Lichtes und durch die Beobachtungsrichtung bestimmt ist, zeigt die Reflexion ein Minimum, wenn die Schwingungsrichtung des einfallenden Lichtes in der gleichen Ebene liegt und ein Maximum senkrecht dazu. Eine Drehung des Polaroids bedeutet daher die Drehung eines Lichtbandes auf dunklem Grunde, und der optomotorische Effekt ist eine Reaktion auf die Bewegung des Lichtbandes.

BAYLOR und SMITH suchten mit einer ähnlichen Anordnung ihre theoretische Auffassung[59] durch Versuche an Bienen zu stützen (zitiert nach KALMUS[62]): sie liessen die Tiere in eine mit Glas bedeckte flache Kammer laufen, die nur durch linear polarisiertes Licht von oben beleuchtet war. Bienen, welche durch die Kammer liefen, stellten sich dabei bevorzugt rechtwinklig zur Schwingungsrichtung ein, wenn der Boden der Kammer mit schwarzem, reflektierendem Papier bedeckt war, während sie über weissem Papier keine bestimmte Richtung bevorzugten.

KALMUS und BAYLOR und SMITH haben hiermit gezeigt, dass Insekten auf polarisiertes Licht indirekt, über ein Reflexionsmuster, ansprechen *können*. Aber es geschieht dies unter Bedingungen, die KALMUS[62] selbst als «experimentellen Artefakt» bezeichnet. Das Tier reagiert auf ein Helligkeitsmuster, das nur bei der unnatürlichen Versuchsanordnung so auffällig in Erscheinung tritt. In seiner späteren Arbeit sagt KALMUS[62] selbst, es sei schwierig, die Orientierung der Bienen nach dem blauen Himmel in gleicher Weise zu erklären. Übrigens haben schon STEPHENS, FINGERMAN und BROWN[38] bei ihrem Versuch, die Spontan-Einstellung von *Drosophila* durch Vorgänge am dioptrischen Apparat zu verstehen, darauf hingewiesen, dass die Reaktionen der Honigbiene für eine solche Deutung zu komplex seien.

Wenn BAYLOR und SMITH[59] trotzdem glauben, bei Bienen auf die Annahme eines intraokularen Analysators verzichten zu können, so übersehen sie die völlig andersartigen Bedingungen bei der Orientierung der tanzenden Bienen gegenüber ihrer eigenen Versuchsanordnung. Sie beobachteten die Vorgänge in total polarisiertem Licht, den Tänzerinnen genügt schon ein geringer Grad der Polarisation und als Quelle derselben irgendwo ein kleines Fleckchen blauen Himmels; sie benützten als Untergrund eine spiegelnde schwarze Fläche, auf der Tanzwabe befinden sich aber dicht gedrängt und in ständiger Bewegung Bienen, an deren Körpern sich ein Polarisationsmuster des Himmels unmöglich so klar spiegeln kann, dass sich die Tänzerinnen präzise danach ausrichten könnten; und sollte wirklich ein erkennbares Helligkeitsmuster entstehen, so *könnte es von der Tänzerin gar nicht wahrgenommen werden*, da sie ja nicht auf einem Postament über den anderen Bienen tanzt, sondern mitten im Gewühl der Kameraden, durch die ihr der Ausblick nach seitlich und schräg nach unten genommen ist.

Und wie sollten die frei fliegenden Bienen an der Landschaft unter sich ein Helligkeitsmuster sehen, das die Polarisation am Himmelsgewölbe getreu spiegelt?

DE VRIES und KUIPER[48] haben sich der Meinung von BAYLOR und SMITH ohne Kritik angeschlossen. Sie selbst bringen gegen eine Analyse des polarisierten Lichtes durch das Facettenauge zwei Argumente vor:

1. (S. 199[48]). Bei Wiederholung der Versuche STOCKHAMMERS an frischem Augenmaterial hätten sie niemals die von ihm beobachtete Doppelbrechung in den Sehstäbchen nachweisen können. STOCKHAMMER sandte mir dazu folgende Stellungnahme: «Der Gegensatz dürfte sich durch die Anwendung verschiedener Methodik erklären. Die holländischen Autoren untersuchten Gefrierschnitte von unfixiertem Material, ich hingegen sowohl Gefrierschnitte von fixierten Sehorganen als auch Präparate von frischen Augen, die weder fixiert noch gefroren waren. Da die Sehstab-Doppelbrechung in Frischpräparaten von mehr als 100 verschiedenen Insektenarten beliebig oft reproduzierbar gefunden wurde, besteht kein Grund zur Annahme, dass die Doppelbrechung ein Artefakt sei. Wahrscheinlich beruht der Misserfolg der holländischen Autoren auf Dislokationen der submikroskopischen Elemente, die in unfixierten und ungefrorenen Augen nicht eintreten und in den Gefrierschnitten von fixierten Augen durch Koagulation oder ähnliche Vorgänge während der Fixierung vermieden werden. Elektronenoptische Beobachtungen von SJOESTRAND (1956 in G. OSTER und A. W. POLLISTER, *Physical Techniques in Biological Research 3*, 241, New York, Acad. Press) an Vertebratensehstäben weisen auf diese Möglichkeit hin.»

[61] H. KALMUS, Nature *182*, 1526 (1958).
[62] H. KALMUS, Nature *184*, 228 (1959).

2. (S. 202[48]). Setzt man ein Insekt in das Zentrum einer Kreisscheibe, die an der Peripherie von einem vertikalen schwarz-weissen Streifenmuster umgeben ist, so beantwortet es bekanntlich eine Drehung des Streifenmusters mit optomotorischen Reaktionen. Die Autoren ersetzten die schwarz-weissen Streifen durch Polaroidstreifen mit abwechselnd horizontaler und vertikaler Schwingungsrichtung, die für unser Auge gleiches Aussehen hatten, aber bei Betrachtung durch eine Polarisationsfolie natürlich abwechselnd schwarz und hell erschienen. Die Insekten zeigten bei Drehung keine optomotorische Reaktion.

De Vries und Kuiper haben leider übersehen, dass ja dem Insektenauge kein Polaroid vorgelagert ist. Nur in diesem Falle wäre zu erwarten, dass die Drehung der Folienstreifen wie die Drehung eines Schwarz-Weiss-Zaunes wirkt (Abb. 3a). Wie oben auseinandergesetzt wurde, ist anzunehmen, dass die Sinneszellen eines jeden Ommatidiums das Licht in verschiedener Richtung polarisieren (Abb. 2). Was dann beim Einfall polarisierten Lichtes geschieht, kann man anschaulich machen, indem man Dreiecke aus Polarisationsfolien in einer Anordnung, wie sie den Sinneszellen im Ommatidium entspricht, zu einer «Sternfolie» zusammensetzt (v. Frisch[3]). Dabei ist für unseren Fall noch zu beachten, dass die Ommen mikroskopisch klein und die Streifen jedenfalls viel grösser waren (es werden keine Masse angegeben). Bei der Drehung des Streifenmusters muss beim Übergang von einem Streifen zum nächsten das Helligkeitsmuster der Sternfolie plötzlich um 90° umspringen und beim nächsten Wechsel um 90° zurückspringen (Abb. 3b). Es ist klar, dass hierbei eine Bewegungsrichtung nicht erkennbar wird. Der negative Ausfall der Versuche von de Vries und Kuiper spricht also nicht gegen unsere Theorie, sondern war vielmehr zu erwarten.

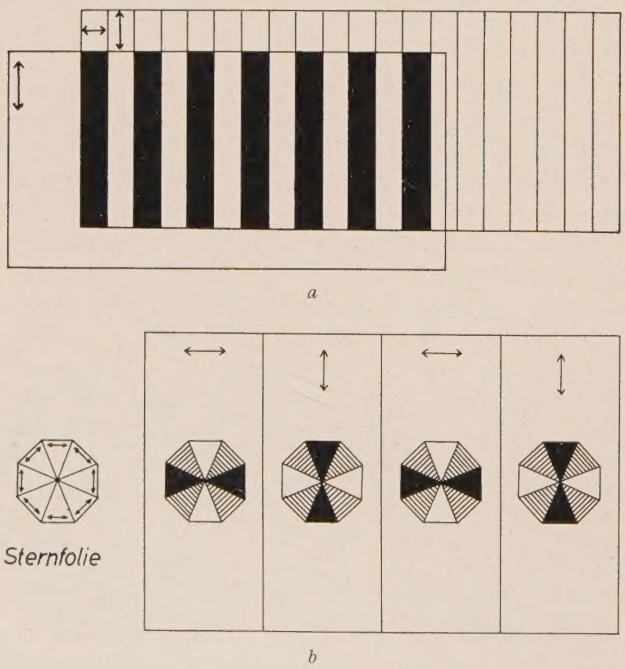


Abb. 3. Streifenmuster aus verschieden orientierten Polarisationsfolien, betrachtet *a* durch eine Folie, *b* durch eine Sternfolie. Die Doppelpfeile geben die Schwingungsrichtung an

Ob eine Orientierung nach polarisiertem Licht durch Reflexionsmuster *unter natürlichen Bedingungen* überhaupt vorkommt, hat unseres Wissens noch niemand geprüft. Keinesfalls kann die Orientierung der Bienen bei ihren Tänzen und bei ihren Trachtflügen auf solche Weise erklärt werden. Da aber diese Meinung auf Grund der Angaben von Kalmus und von Baylor und Smith Anhänger gefunden hat, haben wir sie durch neue Versuche überprüft.

IV. Neue Versuche zur Wahrnehmung der Schwingungsrichtung polarisierten Lichtes durch das Bienenauge

1. Partielle Ausschaltung des Facettenauges[63]

Wir wollen wissen, ob Bienen die Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes am blauen Himmel *über sich* oder an einem Reflexionsmuster *unter sich* ablesen. Theoretisch kann man das leicht entscheiden, indem man einmal die oberen Hälften und einmal die unteren Hälften beider Facettenaugen durch Bedecken mit schwarzen Kappen ausschaltet und dann prüft, ob die Tänze auf der horizontalen Wabe angesichts von blauem Himmel richtig orientiert sind oder nicht. Praktisch scheitert das Experiment daran, dass so behandelte Bienen nicht mehr nach Hause finden oder wenn es ihnen gelingt, sich bald darauf rettungslos verirren. Immerhin hatten schon diese Versuche ein bemerkenswertes Resultat.

Technik. Am Futterplatz, 200 m westlich vom Beobachtungsstock, verkehrt eine Anzahl von numerierten Bienen, die mit der Lage des Platzes seit mehreren Tagen vertraut sind. Versuche werden natürlich nur bei blauem Himmel gemacht. Eine am Zuckerwasser saugende Biene wird mit einer Pinzette vorsichtig abgefangen und in einem Gläschen mit CO_2 betäubt. Zum Bedecken der Augenteile wird eine Mischung von alkoholischer Schellacklösung und feinstem Kienruss mit einem Pinselchen aufgetragen[64]. Das Haften der Kappe wird durch die Behaarung der Augen begünstigt. Da aber die Bienen gleich nach dem Erwachen energische Säuberungsversuche machen, muss man entweder ihre Beine durch einen Faden fesseln oder die Narkose verlängern bis die Schellackkappe nach etwa 5 Minuten erhärtet ist. Manchmal findet man trotzdem später eine Kratzspur. Nachherige Kontrolle ist unerlässlich.

[63] Diese Versuche wurden durch v. Frisch in Brunnwinkl, die auf S. 297 beschriebenen Versuche durch Lindauer und Daumer bei München durchgeführt.

[64] Man täuscht sich leicht über die Dichtigkeit eines solchen Überzuges. Durch Betrachtung von aussen lässt sie sich nicht beurteilen. Es empfiehlt sich, eine Probe der Mischung auf Glas aufzutragen und gegen den hellen Himmel zu prüfen.

Abb. 4. Biene Nr. 4 vom 25.8.59. Rechtes und linkes Auge unten verklebt. Sie tanzte genau richtig. In der Mitte eine normale Biene zum Vergleich

Auf den Futterplatz zurückgebracht, pflegt die Biene nach wiederholten Putzversuchen ihre Saugtätigkeit – zunächst mit Unterbrechungen – fortzusetzen. Oft schliesst sich ein längeres Fächeln mit den Flügeln an. Manchmal fliegt sie schon nach wenigen Minuten, manchmal erst nach $^1/_2$ Stunde, meist nach etwa $^1/_4$ Stunde ab, wobei sie oft himmelwärts nach oben oder seitlich nach einer falschen Richtung entschwindet.

Wenn sie heimfindet und nach einiger Zeit den Verkehr zum Futterplatz wieder aufnimmt, pflegt sie doch nach den ersten Flügen nicht zu tanzen. Sie kehrt schneller zu normalem Verhalten zurück, wenn man die Wabe etwa $^1/_2$ Stunde oder länger verdunkelt lässt.

Bei der Beobachtung der Tänze wird ihr ein etwa 40° breites und etwa 30° hohes Blickfeld zu blauem Himmel im Norden, im Mittel etwa 45° über dem Horizont, freigegeben. Zwischen den Beobachtungen wird das Glasfenster des (horizontal liegenden) Beobachtungsstockes mit einem schwarzen Tuch bedeckt, damit das Volk nicht unruhig wird.

An insgesamt 9 Versuchstagen, Ende Juli, Ende August und in der ersten Septemberhälfte 1959 wurden bei 16 Bienen *beide Augen oben verklebt*. Obwohl in der Hälfte der Fälle die Kappen nur je das obere Drittel der Augen bedeckten, haben von diesen 16 Bienen nur 2 nach Hause gefunden. Sie tanzten beide zunächst desorientiert, später teilweise richtig; es waren aber bei diesen beiden Tieren die Kappen defekt, so dass sie zweifellos Teile des Himmels sehen konnten.

Bei insgesamt 22 Bienen wurden *beide Augen unten verklebt*. Obwohl in 18 Fällen die Augen bis zur Hälfte oder noch darüber hinaus bedeckt waren, haben 11 Tiere nach Hause und 6 auch wieder zurück an den Futterplatz gefunden. Sie hatten Schwierigkeiten beim Anflug, suchten lange herum und stiessen im Flug gegen das Futtergefäss. Nur eine (Nr. 4 vom 25. 8.) verkehrte so lange, dass Tänze beobachtet werden konnten. Einmal machte sie 11 Schwänzelläufe, alle genau richtig nach Westen, nach der nächsten Wiederkehr 6 ebenso genau ausgerichtete, worauf sie zur Kontrolle der Augen am Futterplatz abgefangen und getötet wurde. Die Kappen waren dicht, reichten aber nicht überall bis zur Mitte des Auges hinauf (Abb. 4).

Zusammenfassend stellen wir fest, dass *die oberen Augenpartien für die Orientierung im Gelände wichtiger sind als die unteren*. Denn keine Biene mit gut schliessenden oberen Augenkappen fand den Heimweg, während die Hälfte der Bienen mit unteren, sogar ausgedehnteren Augenkappen nach Hause und zum Teil auch wieder zurück an den Futterplatz kam. Die *Orientierung nach dem polarisierten Himmelslicht* bei den wenigen Tänzen war *bei zwei Bienen mit kleinen und defekten oberen Augenkappen deutlich gestört, bei einer Biene mit grösseren und dichten unteren Kappen einwandfrei richtig*.

Da Bienen mit beiderseits gut schliessenden oberen Augenkappen schon auf dem Heimweg verloren gingen, wurde in weiteren Versuchsreihen *nur das rechte Auge* entweder oben oder unten verklebt, auf Grund folgender Überlegung: Bei der gegebenen Anordnung (Futterplatz im Westen, blauer Himmelsfleck im Norden) sieht die Tänzerin beim Schwänzellauf mit dem rechten Auge den Himmel. Bei unmittelbarer Orientierung nach dem polarisierten Licht sollte also *nach Ausschalten der rechten oberen Augenhälfte* das Einhalten der Richtung nach Westen während des Schwänzellaufes erschwert sein, wenn auch nicht unmöglich, da die Biene in den Wendungen des Tanzes mit dem *linken* Auge ihre *falschen* Einstellungen zum überwiegenden Teil erkennen kann. *Nach Ausschaltung der rechten unteren Augenhälfte* ist keine Störung zu erwarten. – Bei

Orientierung nach einem Reflexionsmuster ist gerade umgekehrt von einer Augenkappe rechts oben keine Beeinträchtigung der Tänze zu erwarten, da ja beide unteren Augenhälften frei sind, während eine Kappe rechts unten eine Störung bewirken sollte.

Die Technik blieb dieselbe. Auch über das Verhalten der Bienen nach der Behandlung ist nichts Neues zu berichten; nur erfolgte der Abflug nach dem einseitigen Eingriff meist schon nach 5–6 min mit Schwankungen von 1–15 min; die Behinderung war offensichtlich geringer.

Von insgesamt 12 Bienen mit *Augenkappe rechts oben* fanden 6 nicht in den Stock zurück, die 6 anderen verkehrten weiter und tanzten. Von insgesamt 9 Bienen mit *Augenkappe rechts unten* fanden alle nach Hause und wieder zum Futterplatz, doch gingen 2 bei den folgenden Flügen verloren, bevor Tänze beobachtet werden konnten. Es bestätigt sich also, dass *der Himmelskompass für die Orientierung im Gelände wichtiger ist als die Bodensicht*[65].

Wir betrachten nun das Verhalten der 6 Heimkehrerinnen mit *Kappe rechts oben. Keine von ihnen tanzte korrekt.* Wir bringen zunächst als typische Beispiele zwei Protokolle im Auszug:

Biene Nr. 41. Am 8. 9. 10^{58} rechts oben verklebt. Erste Rückkehr zum Futterplatz 11^{36}. Zunächst unsicher beim An- und Abflug, fällt oft auf den Rücken. 11^{47} erster Tanzversuch, dreht sich aber nur wie suchend im Kreise. – 11^{53} nach neuem Besuch des Futterplatzes verlässt sie den Stock ohne Tanz. – 12^{05} nur suchendes Herumdrehen. – Stock vorübergehend verdunkelt. – 12^{45} suchendes Drehen im Kreise, einige Schwänzelläufe desorientiert nach verschiedenen Richtungen, einige stark streuend nach Westen, nochmals im Kreise drehen. – 12^{51} ab ohne Tanz. – 12^{57} nach suchendem Herumdrehen 1 Schwänzellauf nach Süd, 4 nach Südwest, 1 WSW, 10 W[66]. – 13^{05} suchendes Drehen mit Schwänzeln im Kreislauf, dann Schwänzelläufe: 1 O, 1 SO, 1 S, 5 W, unterbrochen von weiteren Suchkreisen. – 13^{16} ab ohne Tanz. – 13^{20} nur suchendes Herumdrehen. – 13^{25} Kreisläufe, dann Schw.: 1 N, 1 S, 3 SW, 3 W. – 13^{31} Schw.: 1 O, 1 S, 1 SSW, 3 SW, 6 W, immer wieder unterbrochen von Suchdrehen und Schwänzeln im Kreislauf. – 13^{36} nach Kreisdrehen Schw.: 1 SW, 1 WSW, 3 W, 1 NW. – 13^{42} Suchkreise, dann Schw.: 1 O, 1 N. – 13^{47} suchendes Herumdrehen, zwischendrin 1 Schw. W. – 13^{52} Suchdrehen, Schw.: 1 O, 1 S, 1 SW, 1 WSW, 3 W, 2 WNW, 1 NW. – 13^{58} nur suchendes Kreisdrehen. – Bei der nächsten Wiederkehr getötet. Die Kappe bedeckt das obere Drittel des Auges, lässt aber an dessen Vorderrand einen schmalen Saum fast bis oben frei (Abb. 5 links).

Biene Nr. 64. 12. 9. 10^{15} rechts oben verklebt. Erste Rückkehr zum Futterplatz 10^{37}. Erster Tanz 10^{53}: Dreht sich wiederholt im Kreise, macht 4 Schwänzelläufe desorientiert nach verschiedenen Richtungen, dann noch langes suchendes Drehen im Kreise. – 11^{01} langes Kreisdrehen, dazwischen 1 Schw. nach W. – 11^{06} nur Drehen im Kreise. – 11^{10} nur Kreisdrehen. – 11^{14} Rundtanz mit starkem Tanzgefolge. – 11^{19} langer Rundtanz, dann Schw.: 1 O, 1 SO, nochmals Drehen, Schw. 1 SW, 2 W, wieder Kreisdrehen. – 11^{24} Rundläufe nach beiden Seiten, dazwischen 1 Schw. SW. – 11^{28} suchendes Drehen links herum und rechts herum, Schw.: 1 unscharf W, 1 im Rundlauf. – 11^{32} nach längerem Drehen nach beiden Seiten Schw.: 1 im Rundlauf, 1 S, 1 W. – 11^{36} langer Rundtanz, zwischendurch 1 Schw. W. Bei der nächsten Wiederkehr abgefangen und getötet. Die Kappe bedeckt knapp das obere Drittel des rechten Auges (Abb. 5 rechts).

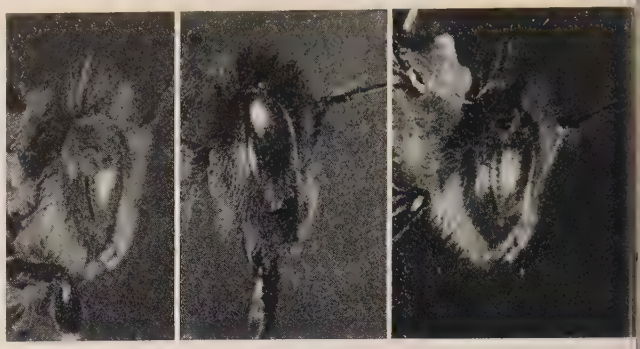


Abb. 5. Rechtes Auge oben verklebt: Links Biene Nr. 41 vom 8. 9., rechts Biene Nr. 64 vom 12. 9. 59. Die Tänze waren weitgehend desorientiert. In der Mitte eine normale Biene zum Vergleich

Von den 12 Bienen mit Augenkappe rechts oben haben also 6 weiter verkehrt. Es ist wohl kein Zufall, dass gerade bei diesen 6 Bienen die Kappe verhältnismässig klein war[65], und bei 3 von ihnen hatte sie überdies oben einen Defekt. Obwohl also die Sicht nach oben nicht im vorgesehenen Ausmasse verhindert war, war *unter 46 beobachteten Tänzen kein einziger normaler Schwänzeltanz.* Das Auffälligste am Verhalten der Tänzerinnen war, dass sie sich immer wieder nach beiden Seiten *im Kreise herumdrehten.* Es wird verständlich unter der Voraussetzung, dass die Polarisation direkt am Himmel abgelesen wird. Denn mit der Augenkappe rechts oben verliert ja die Biene immer gerade dann die Sicht nach dem Himmel, wenn sie sich in die Stellung hineindreht, in der sie zum Schwänzellauf ansetzen soll. In 12 Fällen kam die Tänzerin über das Suchdrehen nicht hinaus. Von den 123 verzeichneten Schwänzelläufen wiesen 55 nach einer falschen Richtung. Siebenmal kam es zu regelrechten *Rundtänzen.* Solche sind sonst bezeichnend für Futterplätze in Stocknähe. Bei einer Entfernung von 200 m treten sie unter normalen Umständen niemals auf. Sie sind gleichsam eine Verlegenheitslösung, wenn die Richtung nicht angegeben werden kann[67].

In klarem Gegensatz hierzu verhielten sich die 7 Tänzerinnen, deren *rechtes Auge unten zur Hälfte verklebt war, durchaus normal.*

Wir bringen wieder zunächst zwei Protokollauszüge:

[65] Es sei noch erwähnt, dass bei den 6 verschollenen Bienen der ersten Gruppe in 5 Fällen die ganze obere Hälfte des rechten Auges verklebt worden war und einmal nur $^1/_3$, bei den 6 wiedergekehrten aber immer nur das obere Drittel oder noch weniger von der Kappe bedeckt war. Bei den 9 Bienen der zweiten Gruppe, die alle wiederkamen, bedeckte die Kappe immer die untere Hälfte, zweimal sogar $^2/_3$ des Auges.

[66] Nicht in der genannten Reihenfolge, die Zahl für jede Richtung wurde nachher zusammengezählt.

[67] Auch Bienen, deren Futterplatz auf einem Funkturm direkt über dem Flugloch lag, so dass eine Himmelsrichtung zum Futterplatz nicht angegeben werden konnte, machten Rundtänze [v. Frisch, Heran und Lindauer, Z. vergl. Physiol. *35*, 219 (1953)].

Abb. 6. Rechtes Auge unten verklebt: *Links* Biene Nr. 37, *rechts* Biene Nr. 39, beide vom 8. 9. 59. Die Tänze waren korrekt. In der Mitte eine normale Biene zum Vergleich

Biene Nr. 37. 8. 9. 9^{16} rechts unten verklebt. 10^{19} erste Rückkehr zum Futterplatz. 10^{52} Tanz: Mehrere Schwänzelläufe richtig nach West. – 11^{03} ab ohne Tanz. – 11^{12} korrekter Tanz, 11 Schw. nach W. – 11^{17} längerer Tanz, 20 Schw. richtig W. – 11^{23} 10 Schw. W. – Bei der nächsten Wiederkehr abgefangen und getötet. Untere Hälfte des rechten Auges gut verklebt (Abb. 6 links).

Biene Nr. 39. 8. 9. 9^{26} rechts unten verklebt. 9^{44} erste Rückkehr zum Futterplatz. 10^{27} erster Tanz. 10 Schw. W, gibt Futter ab, noch 6 Schw. W, gibt nochmals Futter ab, noch 6 Schw. W. – 10^{34} 5 Schw. W. – 10^{39} Kurzer Tanz, 2 Schw. W. – 10^{44} 13 Schw. W. – 10^{48} 6 Schw. W. – Bei der nächsten Wiederkehr abgefangen und getötet. Untere Hälfte des rechten Auges gut verklebt (Abb. 6 rechts).

Bei diesen Bienen war *kein suchendes Herumdrehen* zu bemerken. In 37 beobachteten Tänzen wiesen *225 Schwänzelläufe genau nach Westen, nur 4 nach anderen Richtungen.*

Die Versuche waren zum Teil unwissentlich. Aus dem Verhalten der Tänzerinnen war für den Beobachter klar zu erkennen, ob das Auge oben oder unten verklebt war, auch wenn er es vorher nicht wusste. Als Ergebnis kann festgestellt werden, dass *die Bienen die Schwingungsrichtung des polarisierten Lichtes mit den nach oben gerichteten Augenteilen, also unmittelbar am blauen Himmel ablesen.*

2. *Versuche auf verschieden reflektierendem Untergrund*

Wenn Bienen die Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes nur indirekt an einem Reflexionsmuster des Untergrundes erkennen können, dann ist die Sichtbarkeit eines solchen die Voraussetzung für ihre Orientierung nach polarisiertem Licht. Dementsprechend haben Baylor und Smith (zitiert nach Kalmus[62]) bei ihren Bienenversuchen im Laboratorium eine Einstellung senkrecht zur Schwingungsrichtung *nur auf schwarzem, spiegelndem Grunde* beobachtet, während *auf weissem Grunde keine Richtung bevorzugt* wurde. Auch Kalmus[61] berichtet, dass die optomotorischen Reaktionen seiner Insekten nur über dunklem Untergrund mit starkem Reflexionsmuster deutlich waren, während sie auf hellem Grunde nur schwach oder überhaupt nicht auftraten.

Wir haben nun die Bienen auf einen Fussmarsch mit bestimmter Kompassrichtung dressiert und dann ihre Orientierung nach dem polarisierten Himmelslicht auf schwarzem Untergrund mit starkem Reflexionsmuster und auf weissem Untergrund mit äusserst schwachem Reflexionsmuster vergleichend geprüft. Dabei ergab sich auch die Gelegenheit, Schwänzeltänze auf weissem Untergrund zu beobachten.

Zur *Auswahl der Papiere* für den Untergrund wurden solche in der Dunkelkammer auf einer Tischfläche von oben mit linear polarisiertem Licht bestrahlt und von schräg-seitlich unter verschiedenen Winkeln beobachtet. Ein schwarzes Glanzpapier zeigte bei Drehung der Polarisationsfolie *F* (Abb. 7) sehr auffällig ein Maximum der Reflexion bei Betrachtung senkrecht zur Schwingungsrichtung und ein Minimum nach Drehung der Folie um 90°. Man konnte nach der Helligkeit die Stellung der Folie richtig angeben. Bei einem weissen Glanzpapier und bei einem weissen Mattkarton[68] war mit blossem Auge eine Änderung der Helligkeit bei Drehung der Folie nicht mit Sicherheit zu erkennen.

Um diese Unterschiede objektiv festzuhalten, wurde die Reflexion bei verschiedener Folienstellung mit folgender Anordnung gemessen (Abb. 7):

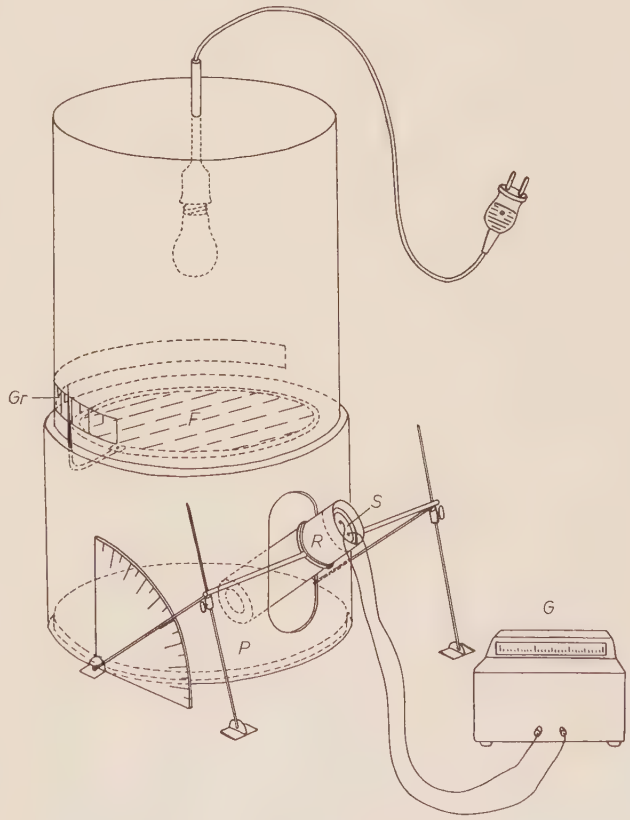


Abb. 7. Anordnung zur Messung des Reflexionsmusters der verwendeten Papiere. P = Papierfläche, F = drehbare Polarisationsfolie, Gr = Gradeinteilung für Folienstellung, R = Rohr mit S = Selenzelle, G = Galvanometer

[68] Alle 3 Papiere bezogen von der Firma Feucht, München.

Die Papierbogen P (Schwarzglanz, Weissglanz, Weissmatt) wurden auf Sperrholzplatten straff und knitterfrei aufgezogen und am Boden eines Zylinders, der mit schwarzem Samt ausgekleidet war, aufgelegt. Sie wurden von oben aus einem dem Zylinder aufgesetzten Lampenkasten mit einer Osramlampe (100 Watt) angestrahlt, wobei das Licht eine Polarisationsfolie F passieren musste. Unter verschiedenem Blickwinkel (50°, 30°, 15°) wurde unter Drehung der Folie die Intensität des vom Papier reflektierten Lichtes mit Hilfe einer Selenzelle (SAF, Nürnberg) gemessen. Um Streulicht abzuhalten, wurde die Selenzelle in ein mit schwarzem Samt ausgeschlagenes Rohr eingebaut, dessen vordere Öffnung einen Durchmesser von 4,5 cm hatte («schwarzer Körper»). Dem Photoelement war ein hochempfindliches Galvanometer (Kipp-Delft/Holland) angeschlossen; 40 Teilstriche entsprachen etwa – umgerechnet auf Tageslicht – 1 Lux. Der Lichtquelle war ein Spannungskonstanthalter vorgeschaltet.

Die Tabelle bringt die Ergebnisse dieser Messungen. Während bei Schwarzglanzpapier in Abhängigkeit von der Folienstellung Helligkeitsunterschiede bis nahe an 50% auftreten, sind diese bei Weissglanz und Weissmatt verschwindend klein. Somit sollte erst recht unter freiem Himmel eine Orientierung über den weissen Papieren unmöglich sein, wenn wirklich das Reflexionsmuster der entscheidende Faktor ist.

Helligkeitsunterschiede des Reflexionsmusters bei Drehung der Folie um 90°

Reflektierende Unterlage	Aufblickwinkel	Stellung der Folie	Galvanometerausschlag	% (90° Stellung = 100%)
Schwarzglanz	50°	0°	7,23	54,24
		30°	8,83	66,24
		60°	12,33	92,50
		90°	13,33	100
Weissglanz	50°	0°	84,67	96,77
		30°	85,5	97,71
		60°	86,5	98,86
		90°	87,5	100
Weissmatt	50°	0°	90,0	95,74
		30°	90,83	96,63
		60°	92,33	98,22
		90°	94	100
Schwarzglanz	30°	0°	1,13	59,47
		30°	1,27	66,84
		60°	1,7	89,47
		90°	1,9	100
Weissglanz	30°	0°	60,33	97,31
		30°	61,67	99,47
		60°	61,83	99,73
		90°	62	100
Weissmatt	30°	0°	67,83	96,21
		30°	68,5	97,16
		60°	69,67	98,82
		90°	70,5	100
Schwarzglanz	15°	0°	1,17	61,58
		30°	1,37	72,11
		60°	1,77	93,16
		90°	1,9	100
Weissglanz	15°	0°	31,17	94,94
		30°	31,83	96,95
		60°	32,33	98,48
		90°	32,83	100
Weissmatt	15°	0°	23,07	96,13
		30°	23,43	97,63
		60°	23,73	98,88
		90°	24	100

Jeder Wert (Galvanometerausschlag) ist das Mittel aus 3 Ablesungen. Die Unterschiede zwischen diesen waren minimal

Die für die Messungen verwendete Osramlampe hatte ihre maximale spektrale Strahlstärke im Gelbbereich. Bienen nehmen auch *Ultraviolett* wahr (400–300 mμ), in dieser Lichtbereich hat für sie die grösste Reizwirksamkeit[49]. Wir machten deshalb Kontrollmessungen mit einer HQV-Lampe (Osram, 125 Watt). Maxima der spektralen Strahlstärke liegen hier bei 312, 334, 365 und 405 mμ, die Selenzelle ist bis 325 mμ empfindlich. Wir verwendeten UV-durchlässige Polarisationsfolien[69]. Die prozentualen Helligkeitsunterschiede bei verschiedener Folienstellung entsprachen weitgehend jenen der Tabelle, so dass wir von einer Wiedergabe der Werte absehen können.

a) *Dressur auf einen Fussmarsch mit bestimmter Kompassrichtung.* Wir benützten eine Versuchsanlage, wie sie Jacobs-Jessen[23] im Anschluss an Jander[28] zur Prüfung der Orientierung von Hummeln ausgearbeitet hatte. Die Bienen, ein Krainer-Italiener-Bastardvolk, können ihren Stock (St, Abb. 8) nur durch eine vertikale Holzröhre verlassen und gelangen so in das Zentrum einer waagerechten, drehbaren Kreisplatte von 70 cm Durchmesser, wo sie mit Ausnahme des Himmels über sich keine Orientierungsmöglichkeit haben. Die Anlage ist nämlich auf einem weiten ebenen Feld aufgestellt und die Sicht nach dem Horizont durch ein doppelt gefaltetes engmaschiges Drahtgitter (G) genommen. Eine Glasscheibe (Gl) in 1 cm Abstand vom Boden der Arena hindert die Bienen, aufzufliegen. Sie können den Raum nur durch ein am Südrand gelegenes Flugloch F verlassen und bei A abfliegen.

Eine numerierte Schar trägt von einem Futterplatz 65 m südlich Zuckerwasser ein. Um auf dem Fussmarsch durch die Arena die Orientierung nach einer Duftspur zu verhindern, wird die Platte alle 10 min in eine andere Stellung gedreht. Am Rande sind insgesamt 8 Fluglöcher angebracht, die in systematischem Wechsel nach Süden zu liegen kommen und dann offen sind, während die 7 anderen verschlossen gehalten werden. Natürlich wird die Scheibe auch vor jedem *Versuch* gedreht. Da Duftspuren nach allen 8 Löchern führen, verhelfen sie nicht zur Orientierung. Überdies wird die Arena vor jedem Versuch mit einem frischen duftlosen Karton ausgelegt. Die Richtung zum Ausflug, bzw. bei heimkehrenden Bienen die Richtung zur zentralen Stocköffnung muss nach der Sonne, oder bei abgedeckter Sonne nach dem polarisierten Himmelslicht gesteuert werden. Wenn das polarisierte Licht durch ein Reflexionsmuster des Untergrundes wahrgenommen wird, sollte die Fähigkeit zur Orientierung auf weissem Untergrund versagen. Die aus dem Stock kommenden Bienen *strebten aber auch auf Weiss bei abgedeckter Sonne deutlich nach Süden.*

[69] Für deren Herstellung und Überlassung danken wir der Firma Erwin Käsemann, optische Werkstätten, Oberaudorf am Inn.

Da die auslaufenden Tiere durch den behinderten Abflug stark gestört waren und immer wieder gegen die Glasplatte stiessen, war die Streuung der Laufrichtungen sehr gross. Wir wählten daher für die Registrierung der Läufe die ruhigeren *heimkehrenden* Bienen. Sobald sie durch die südliche Öffnung einpassiert waren, suchten sie meist in einigen engen Schleifen nach Futterabnehmerinnen, die sie manchmal schon in der Arena erwarteten. Wenn keine zur Stelle waren, schlugen sie die Richtung nach Norden ein, wobei Abweichungen nach links oder rechts immer wieder korrigiert wurden, so dass sie in einer Schlangenlinie liefen. Protokolliert wurde auf der Deckplatte der Punkt, wo der Weg der

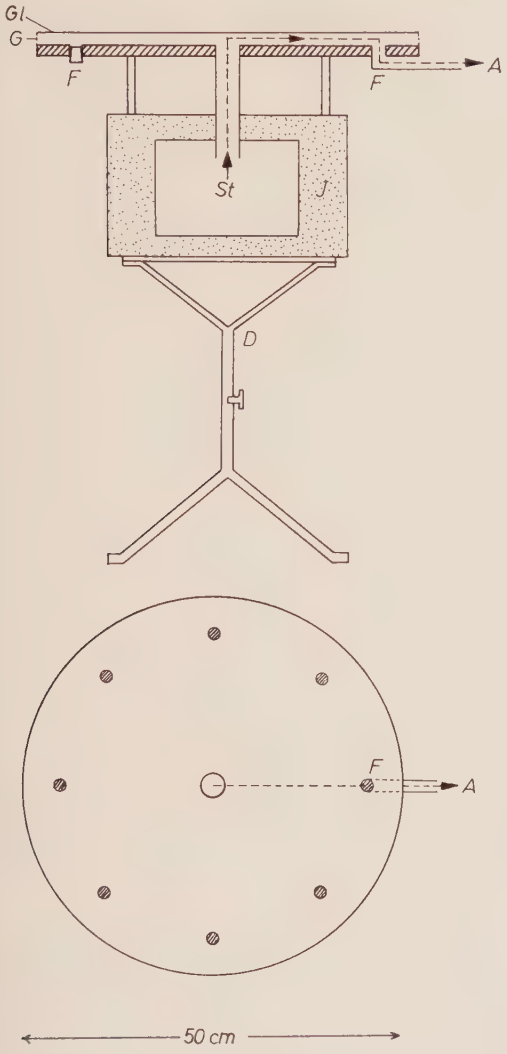


Abb. 8. Anordnung zur Dressur auf einen Fussmarsch der Bienen mit bestimmter Kompassrichtung. *Oben:* St = Bienenstock, F = Flugloch, A = Abflug ins Freie, G = Gitter, Gl = Glasplatte, J = Isoliermasse zur Warmhaltung des Bienenstockes. *Unten:* Die Drehplatte von oben gesehen

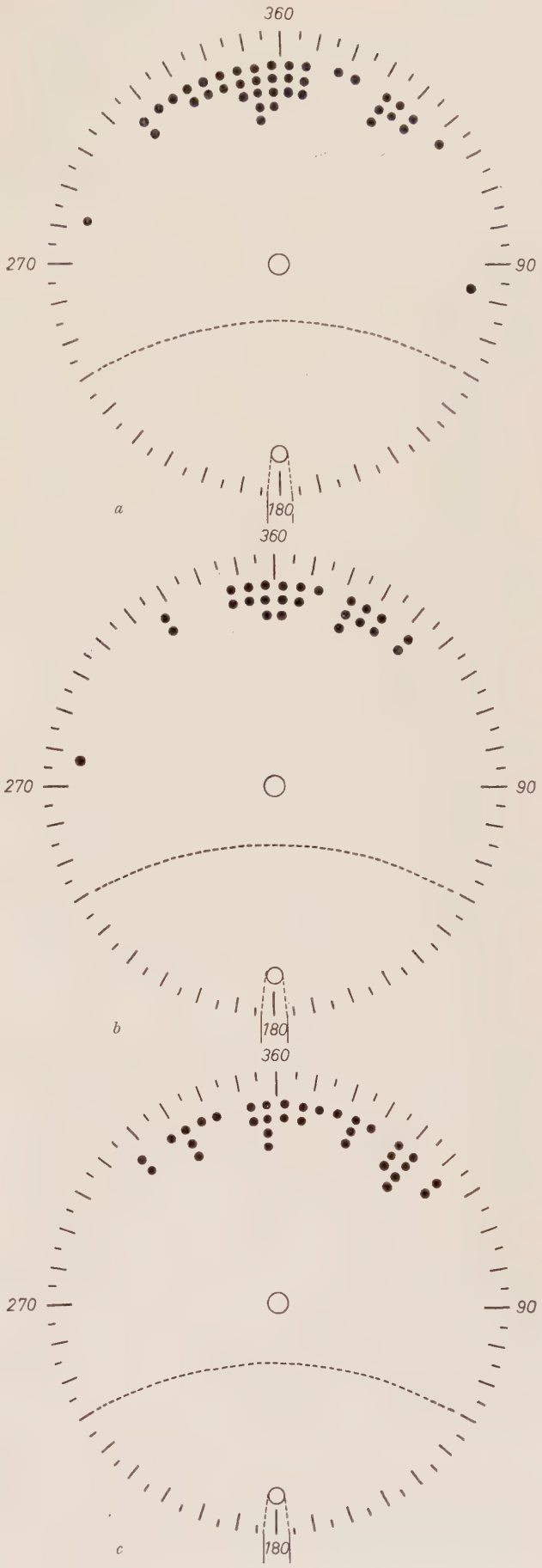


Abb. 9. Die Richtungsorientierung von heimkehrenden, nach Norden strebenden Bienen in der Arena: *a* auf mattweissem Papier, *b* auf weissem Glanzpapier, *c* auf schwarzem Glanzpapier. Jeder Punkt gibt die Laufrichtung eines Tieres an. Nähere Erklärung im Text

Biene eine Bogenlinie noch vor dem Zentrum der Arena kreuzte (Abb. 9a–c). In den Abbildungen sind die Punkte nach der Peripherie projiziert (durch Verlängerung der Verbindungslinie von der Eintrittsöffnung zum Kreuzungspunkt mit der Bogenlinie). Jeder Punkt gibt die Laufrichtung eines Tieres an. Die Richtungen wurden an der Peripherie für je 5° zusammengefasst.

Man bemerkt eine gewisse Streuung, wie sie bei gleicher Anordnung – selbst bei frei sichtbarer Sonne – auch in den Versuchen von Jacobs-Jessen mit Bienen, Hummeln und Wespen auftrat ([23], S. 604, Abb. 5). Es ist aber klar ersichtlich, dass die Heimkehrer auch auf weissem Untergrund nach Norden strebten (Abb. 9a, b) und dass ihre Orientierung nicht verbessert wurde, wenn der Bodenbelag der Arena aus schwarzem Glanzpapier bestand (Abb. 9c). *Die Bienen haben sich also unmittelbar nach dem polarisierten Himmelslicht orientiert.*

Der *Beobachter* war für die Bienen teilweise sichtbar. Er *wechselte seine Stellung bei jedem Versuch*, ohne dass das Verhalten der Tiere dadurch beeinflusst wurde. Sie richteten sich also nicht nach ihm.

Man könnte aber einwenden, dass sie den zentralen Eingang geruchlich angesteuert hätten. Die Ergebnisse änderten sich jedoch nicht, wenn die zentrale Stocköffnug dicht verschlossen war[70]. Auch wurden Bienen, die bei offenem Loch wenige Zentimeter seitlich von der Öffnung in der Richtung nach Norden vorbeikamen, nicht abgelenkt.

Man könnte schliesslich daran denken, die Bienen hätten das Zentrum angesteuert, indem sie von der beiderseitigen Begrenzung der Arena gleichen Abstand einhielten. Das kann nach anderweitigen Erfahrungen über die Verwertung optischer Marken nicht angenommen werden. Vom Zentrum aus erschien das Gitter unter einem Sehwinkel von nur etwa $1^1/_2°$ (vgl. v. Frisch und Lindauer[4]). Völlig widerlegt wird die Annahme dadurch, dass Bienen, die bei ihren Suchschleifen nach dem Betreten der Arena einige cm seitwärts abgekommen sind, von da aus auch die Richtung nach Norden und nicht nach dem Zentrum einschlugen.

b) *Schwänzeltänze auf weissem Grunde.* Die warme Witterung an den Versuchstagen hatte zur Folge, dass sich manchmal einige Stockbienen vor dem Stockeingang auf der Fläche der Drehscheibe aufhielten und schon da den heimkehrenden Sammlerinnen das Futter abnahmen. Dadurch wurden diese zu Tänzen auf der horizontalen Fläche veranlasst, wie es unter normalen Verhältnissen an heissen Tagen auf dem horizontalen Anflugbrettchen eines Bienenstockes vorkommt. Zu ihrer Orientierung stand den Bienen nur der blaue Himmel oder ein Reflexionsmuster auf dem Tanzboden – wenn ein solches vorhanden war – zur Verfügung. Die Sonne war bei allen Beobachtungen so abgeschirmt, dass die ganze Drehscheibe im Schatten lag. Die Tänzerinnen konnten die Bodenfläche sehen, was unter normalen Umständen auf einer vollbesetzten Wabe nicht zutrifft; denn in der Arena befanden sich stets nur wenige Stockbienen, und während einige der Tänzerin nachliefen, war vor ihr und in seitlicher Richtung das Blickfeld frei.

Es konnten auf dem mattweissen Untergrund 9 Tänze mit rund 100 Schwänzelläufen und auf dem weissen Glanzpapier 4 Tänze mit 22 Schwänzelläufen, die *ausnahmslos richtig orientiert waren* und genau nach Süden wiesen, beobachtet werden. Versuche auf dem schwarzen Glanzpapier waren wegen der vorgeschrittenen Jahreszeit und eintretender Kälte nicht mehr möglich. Sie waren auch unnötig, denn sie hätten ja nur zeigen sollen, ob die Orientierung auf schwarzem Glanzpapier verbessert wird. Die Tänze waren aber auf dem weissen Grund so exakt, dass eine Verbesserung gar nicht möglich gewesen wäre.

Wir haben bei den Versuchen unter freiem Himmel die Papiere verwendet, deren Reflexionsmuster wir in der Dunkelkammer unter günstigsten Bedingungen geprüft hatten. Es fragt sich, ob *unter den Verhältnissen des Freilandversuches* Reflexionsmuster überhaupt erkennbar sind und ob sie zur Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes in klarer Beziehung stehen. Um dies zu erfahren, stellten wir im März 1960, als die Sonnenhöhe ähnlich war wie bei den herbstlichen Versuchen, den Drehtisch nochmals auf dem Versuchsfeld auf und prüften die Helligkeitsverteilung auf der Arena mit der Selenzelle. Dabei stellte sich heraus, dass durch die Abschattung des direkten Sonnenlichtes, wie sie stets dann vorgenommen wurde, wenn die Läufe oder Tänze der Bienen zu beobachten waren, ferner durch die oftmals geänderte Stellung des Beobachters neben der Arena und durch das gelegentliche Auftreten und Wandern einzelner Haufwolken eine ständig *wechselnde Helligkeitsverteilung auf der Arena bewirkt wurde, welche* – auch auf dem schwarzen Glanzpapier – *ein vom polarisierten Himmelslicht abhängiges Reflexionsmuster in ungeordneter Weise bei weitem übertraf.* Würden die Bienen die Schwingungsrichtung des polarisierten Himmelslichtes an einem Helligkeitsmuster des Untergrundes ablesen, so hätten bei unseren Versuchen vielfache Störungen in ihrer Orientierung auftreten müssen. Das war nicht der Fall. Somit ist es *völlig ausgeschlossen, dass sie bei ihren gezielten Fussmärschen und bei ihren exakten Tänzen die Himmelsrichtung an einem Reflexionsmuster erkannt hätten.*

Wir sind der Meinung, dass die Fähigkeit zur Analyse des polarisierten Lichtes kein Privileg der Bienenaugen ist, sondern auch den Augen anderer Arthropoden in weitester Verbreitung zukommt. Dafür spricht, dass eine menotaktische Orientierung nach dem polarisierten Himmelslicht unter natürlichen Freilandbedingungen bei verschiedenen, im System weit voneinander entfernten Vertretern der Gliederfüsser erwiesen ist.

[70] Bei 6 Versuchen mit 50 registrierten Läufen war der zentrale Zugang zum Stock offen, bei 6 anderen Versuchen mit 48 registrierten Läufen verschlossen.

Summary

I. Dancing bees indicate to their hive-mates the direction towards a goal by tail-wagging dances. In dancing, they orient themselves according to the position of the sun in the sky or, when the sun is covered, according to the polarized light visible in the sky. A small spot of blue sky suffices for the bee to be able to indicate the direction correctly. Experiments with polaroid have proved that it is the direction of vibration of the polarized light which is the determining factor in this case. Polarized light can also be used as a substitute for the missing sun during their free flight through the landscape.

Orientation by means of polarized light has also been found to exist in many other Arthropods. Certain species of insects, custaceans and even spiders are able, with the help of their memories, to maintain *any* angle with the direction of vibration of polarized light, just as bees are (Menotaxis), while others again, from the outset, will orient themselves so as to form a definite fairly constant angle – usually a right angle – with the plane of vibration (Tropotaxis).

II. Electrophysiological, polarization-optical, and electron-microscopical studies have indicated unanimously that polarized light is analyzed within the compound eyes of insects, in the rhabdomeres of the visual cells (radial analyzers Fig. 2).

III. Several views contradictory to this have been put forward:

1. The analyzer is situated within the dioptric apparatus. – This assumption has been proved wrong for insects, their optical system having been more closely investigated. It appears to be improbable for other Arthropods as well – having no foundation whatsoever.

2. The reactions of bees are not based on direct analysis of the plane of polarisation, but on their recognition of the pattern of brightness produced by it in the surroundings or on the substratum, as a secondary effect. – Such an assumption, however, cannot explain the orientation of bees according to the polarization of the sky's light, for under natural conditions, the prerequisites for the production of clear reflection patterns are not met. And even if such a reflection pattern should once be produced, the dancing bees would be unable to recognize it, since dancing in the throng of their companions they can have no view of the background.

IV. Since the assumption of an indirect recognition of the plane of polarization has nevertheless found some acceptance, we have checked it by performing some new experiments.

1. It is clear that for a direct analysis of the polarized sky's light during the dance on a horizontal comb, the *upper parts* of the eyes would be needed, while, on the other hand, the *lower parts* of the eyes would be essential for the recognition of a reflection pattern. Now, whenever a sector of the upper eye has been masked, the orientation of the dances was heavily impaired (Fig. 5), whereas even extensive masking of the lower part of the eye did not impair orientation at all (Fig. 6).

2. When bees are forced to walk, they can be trained to walk in a certain direction of the compass. Although their only means of orientation was polarized sky's light, their orientation was just as good on a white substratum (which even under the most favourable conditions does not give a clear reflection pattern) as on a black, glossy substratum (which gives a very obvious reflection pattern under favourable conditions), Fig. 9. On a white substratum, many dances could be observed: all, without exception, were correctly oriented.

3. Under the natural conditions prevailing in the experiments performed in the open, the reflection pattern of the polarized sky's light was obliterated or altered by secondary influences exerted by the surroundings (shading, position of the observer, cloud formation), without the orientation of the bees being in the least impaired.

Thus it has been proved that, in our experiments, the bees oriented themselves through a direct analysis of the blue sky's light, and not according to a reflection pattern.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

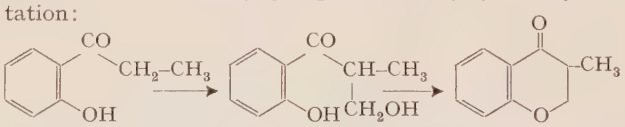
Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi communicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents

A New Synthesis of 3-Substituted Chromanones

In the course of our researches into the chromone group, we have examined some possibilities of synthesis offered by the fundamental intermediates of this class of compounds, i.e. the *o*-hydroxyarylalkylketones.

We showed recently[1] that the Marasse modification of the Kolbe-Schmitt synthesis[2], when applied to *o*-hydroxyarylalkylketones, gives rise to the corresponding benzotetronic acids. We have now found that from the reaction between formaldehyde and an *o*-hydroxyarylalkylketone it is possible to obtain a 3-substituted chromanone. For instance, the sodium salt of *o*-hydroxypropiophenone, in aqueous medium, at 50°C, reacts with an equivalent quantity of formaldehyde with separation, after some time, of an oleous layer, consisting of the 3-methylchromanone.

The reaction probably runs through a β-ketoalcohol formed by the electrophilic attack of formaldehyde on the α-carbon of the carbonyl group, followed by cyclodehydratation:



This course recalls that postulated by Reichel and Müller[3] for the synthesis of the flavanone, starting from

[1] P. Da Re and E. Sandri, Ber. deutsch. chem. Ges. *93* (1960), in press.

[2] A. S. Lindsey and H. Jeskey, Chem. Rev. *57*, 583 (1957).

[3] L. Reichel and K. Müller, Ber. deutsch. chem. Ges. *74*, 1741 (1941).

o-hydroxyacetophenone and benzaldehyde in alkaline medium.

This new procedure affords a convenient route to the 3-substituted chromanones and it has been experimented successfully on some *o*-hydroxyarylalkylketones, such as *o*-hydroxypropiophenone, quoted above, and its 5-bromo and 5-methyl derivatives, *o*-hydroxybutyrophenone and the *o*-hydroxyphenylbenzylketone.

In the case of *o*-hydroxyacetophenone, we have obtained only a polymeric material and, with the *o*-hydroxyisobutyrophenone, the 5-hydroxymethyl derivative. Evidently the presence or the absence of a substituent on the active methylene group is sufficient to orient the reaction in another direction.

P. Da Re and L. Verlicchi

Research Department of Recordati-Laboratorio Farmacologico S. p. A., Milano (Italy), April 21, 1960.

Riassunto

Viene descritta una semplice sintesi di cromanoni 3-sostituiti, da *o*-idrossiarilalchilchetoni e formaldeide in ambiente alcalino.

Alkaloids of Apocynaceae V
Hunterine, a New Alkaloid from *Hunteria eburnea* Pichon[1]

Recently, Bartlett, Taylor, and Raymond-Hamet have described four new alkaloids from the bark of *Hunteria eburnea* Pichon[2] and have shown that they represent a new class of indole alkaloids[3]. We wish to report the isolation and characterization of another new alkaloid, hunterine, from the root bark of *Hunteria eburnea* Pichon[4].

A careful chromatography of the alkaloidal fraction on deactivated alumina using benzene-chloroform mixtures (1:3) and chloroform as eluents yielded the crude base. Crystallization from methanol or methanol-chloroform mixture afforded hunterine in colorless plates, m. p. 264–265°C (dec. uncorr.), $[\alpha]_D^{27} = -205{\cdot}1$ ($CHCl_3$, C = 1).

Calc. for $C_{42}H_{52}O_4N_4$: C, 74·52; H, 7·74; O, 9·46; N, 8·28; OCH_3 (1), 4·59; $N(CH_3)$ (1), 2·22. Found: C, 74·60; H, 7·49; O, 9·38; N, 8·57; OCH_3, 4·96; $N(CH_3)$, 2·40.

The hydrochloride was prepared in the conventional manner and recrystallized from acetone, m. p. > 270°C (dec.).

Calc. for $C_{42}H_{52}O_4N_4 \cdot 2\,HCl$: C, 67·27; H, 7·26; Cl, 9·46; OCH_3 (1), 4·11. Found: C, 67·01; H, 7·49; Cl, 9·60; OCH_3, 4·18.

Electrometric titration of hunterine in 66% aqueous dimethyl formamide indicates the molecular weight of 685 ± 25 (Calc. for $C_{42}H_{52}O_4N_4$: 678·8) with two basic groups, pK_a' 7·0 and 7·4 as well as one acidic group, pK_a' 12·6. The ultraviolet spectrum is characterized by the following bands: λ_{max}^{EtOH} 228 mμ, $a_M = 38{,}500$; 293 mμ, $a_M = 11{,}300$, and 250 mμ, $a_M = 9{,}500$ (shoulder).

The band at 293 mμ shifts to a broader band at 305 mμ in the alkaline solution (phenolic group, pK_a' 12·6, *vide supra*). This spectrum is tentatively interpreted as resulting from the additive effect of dihydroindole and 5-hydroxyindole chromophores[5].

The infrared spectrum of hunterine in chloroform solution shows a band at 5·75 μ, $a_M = 375$ (M. W. 685) and indicates the presence of one unconjugated ester per molecule[5]. The band envelope with maxima at 6·16 and 6·20 μ is also consistent both in wave length and intensity with the presence of 5-hydroxyindole and dihydroindole moieties as was shown by comparison with the spectra of appropriate models[6]. While the band of free indole NH is missing at 2·90 μ, there is a band at 2·77 μ and an intense underlying absorption from 2·9 to 4·5 μ indicative of free and hydrogen bonded hydroxyl.

These as yet preliminary data suggest that hunterine represents another example of dimeric indole-indoline alkaloids[7]. Hunterine was shown to exhibit hypotension of short duration in anesthetized animals at 1 mg/kg[8].

Acknowledgment. The authors are grateful to Dr. H. E. Boaz for the infrared data, Mr. L. G. Howard for the ultraviolet data, Messrs. W. L. Brown, R. Hughes, H. L. Hunter, and G. M. Maciak for microanalyses, and Dr. F. G. Henderson for pharmacological testing.

N. Neuss and Nancy J. Cone

Lilly Research Laboratories, Indianapolis (Indiana), December 11, 1959.

Zusammenfassung

Hunterin wird als ein neues Alkaloid aus der Wurzelrinde von *Hunteria eburnea* Pichon beschrieben. Die analytischen und physikalischen Eigenschaften dieser Verbindung weisen darauf hin, dass Hunterin ein dimeres Alkaloid vom Indol-Indolin-Typus darstellt.

[1] Paper IV in this series see Exper. *15*, 414 (1959).

[2] Another *Hunteria* species, *H. corymbosa* Roxb. was investigated by M. Greshoff and a crystalline alkaloid isolated; however, no data on the compound were given. Ber. deutsch. chem. Ges. *23*, 3537 (1890).

[3] F. Bartlett, W. I. Taylor, and Raymond-Hamet, C. R. Acad. Sci., Paris *249*, 1259 (1959). The appearance of this work has prompted the presentation of this preliminary communication. The physical properties and formulae of these alkaloids are in good agreement with the data obtained on alkaloids isolated in our laboratories and tentatively named huntericine, hunteridine, and hunteriline. Therefore, we assume that these compounds are identical with eburnamonine, isoeburnamine, and eburnamine respectively, and refrain from repeating our analytical and physical data as well as from the usage of our names for these alkaloids. We should like to thank Dr. Taylor for calling his work to our attention.

[4] Commercial sample from S. B. Penick & Co., New York, N. Y., U.S.A.

[5] For comparison, see the spectrum of sarpagine and ajmaline in N. Neuss, *Physical Data of Indole and Dihydroindole Alkaloids* (Lilly Research Laboratories, Indianapolis, Indiana, July 1959).

[6] The model substances were: bufotenine, $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ 6·15 and 6·30 μ, and ajmaline, $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ 6·23 μ. The spectra were recorded on a Beckman, Model IR 7, Infrared Spectrophotometer using a 2·0 mm cell.

[7] M. Gorman, N. Neuss, and G. H. Svoboda, J. Amer. chem. Soc. *81*, 4745 (1959).

[8] Hypotensive effects of extracts of *Hunteria eburnea* were first reported by Raymond-Hamet, C. R. Acad. Sci., Paris *240*, 1470 (1955) and subsequently by Engelhard and Gelbrecht, Naturwissenschaften *45*, 547 (1958).

Der Einbau von ^{35}S in die Kostalknorpel von Meerschweinchen unter Einfluss verschiedener Glucocorticoide

Von Layton[1,2] wurde erstmals mittels radioaktiv markiertem Natriumsulfat untersucht, ob Cortison die Chondroitinsulfat-Synthese zu beeinflussen vermag. Das Mucopolysaccharid Chondroitinsulfat ist Hauptbestandteil von Knorpel- und Bindegewebe (Grundsubstanz und Kollagen) und spielt im Organismus eine vielseitige und wichtige Rolle. Layton[1] stellte bei cortisonbehandelten Ratten in der Grundsubstanz und im Kollagen der Haut einen geringeren ^{35}S-Gehalt fest als bei normalen Kontrolltieren. Dieser Befund konnte später von Boström und Odeblad[3] und von Schiller und Dorfman[4] bestätigt werden. Ausserdem fanden Boström und Odeblad[3] im Kostalknorpel von Versuchsratten eine stark verminderte ^{35}S-Einlagerung unter Cortisoneinfluss. Ergänzend beobachtete Hublé[5] in den Röhrenknochen von Cortison-Kücken eine Hemmung der Chondrogenese, eine Verschmälerung der Knorpelzone, eine verlangsamte Verknöcherung und insgesamt ein verzögertes Wachstum. Übereinstimmend konnte auch bei *in-vitro*-Versuchen mit Kalbs- oder Rattenknorpel ein verminderter ^{35}S-Einbau in das Chondroitinsulfat bei Zugabe von Cortison festgestellt werden (Boström und Odeblad[3], Clark und Umbreit[6]). In früheren *in-vitro*-Versuchen von Layton[2] an Wundgewebe von Kücken liess sich sogar eine völlige Hemmung der Chondroitinsulfat-Synthese bei Zugabe von Cortisonazetat beobachten. In ähnlichen Versuchen mit Meerschweinchen-Wundgewebe trat nach Kodicek und Loewi[7] mit Cortisonazetat keine Hemmung der Schwefelaufnahme auf, während mit Cortisonalkohol eine gewisse Förderung festzustellen war.

Zusammenfassend ergibt sich somit, dass das Glucocorticoid Cortison – abgesehen vom letzterwähnten *in-vitro*-Befund – die Chondroitinsulfatsynthese hemmt. Dies ist sowohl *in vivo* wie *in vitro* für verschiedene Gewebe, wie Knorpel, Haut, u. a., von den bisherigen Autoren übereinstimmend festgestellt worden.

Da Cortison im Organismus nicht oder doch nur in geringen Mengen gebildet wird, so schien es uns interessant, vergleichsweise auch das natürliche Nebennierenrinden-Glucocorticoid, das Hydrocortison und das ihm nächstverwandte Prednisolon in bezug auf die Chondroitinsulfat-Synthese zu prüfen. Ferner sollten auch die in neuester Zeit synthetisierten und therapeutisch empfohlenen Corticoide, das 6α-Methyl-prednisolon und die beiden 9α-Fluorderivate, das Triamcinolon und Dexamethason, in die Untersuchung einbezogen werden[8]. Der Schwefeleinbau in Knorpelgewebe unter Hydrocortison-Einfluss ist schon untersucht worden, während für die anderen der genannten Glucocorticoide noch keine entsprechenden Arbeiten vorliegen. Clark und Umbreit[6] stellten bei *in-vitro*-Versuchen an Rattenknorpel eine erhöhte Schwefelaufnahme unter Zugabe von Hydrocortison fest, während sich in den Vergleichsversuchen mit Cortison, wie schon erwähnt, eine gewisse Hemmung ergeben hatte. Collins und Anilane[10] fanden in ihren jüngst durchgeführten *in-vivo*-Versuchen, dass der Einbau von ^{35}S in die Kostalknorpel von Ratten durch Hydrocortison weder in förderndem, noch in hemmendem Sinne beeinflusst wird; die Knorpelsubstanz enthielt gleichviel markierten Schwefel wie jene der Kontrolltiere. Der Vollständigkeit wegen sei noch die Arbeit von Schiller und Dorfman[4] angeführt; die Autoren prüften allerdings nicht den ^{35}S-Einbau an sich, sondern die zeitliche Abnahme des ^{35}S-Gehaltes in der Rattenhaut unter Hydrocortison-Einfluss. Sie fanden vom vierten Tage an einen etwas verlangsamten «turnover».

[1] L. L. Layton, Arch. Biochem. Biophys. *32*, 224 (1951).
[2] L. L. Layton, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. *76*, 596 (1951).
[3] H. Boström und E. Odeblad, Ark. Kemi *6*, 39 (1953).
[4] S. Schiller and A. Dorfman, Endocrinology *60*, 376 (1957).
[5] J. Hublé, Acta endocr. *25*, 59 (1957).
[6] I. Clark and W. W. Umbreit, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N.Y. *86*, 558 (1954).
[7] E. Kodicek and G. Loewi, Proc. R. Soc. [B] *144*, 100 (1955).
[8] Für nähere Angaben über Chemie und Wirkungsweise der natürlichen und synthetischen in der Therapie gebräuchlichen Corticoid-Derivate sei auf die ausgezeichnete Übersicht von Beiglböck[9] verwiesen.
[9] W. Beiglböck, Wien. med. Wschr. *109*, 585 (1959).
[10] E. J. Collins and J. Anilane, Exper. *15*, 116 (1959).
[11] K. Bailey, Biochem. J. *31*, 1396 (1937).

Schwefeleinbau (^{35}S) in die Kostalknorpel von Meerschweinchen, unter Einfluss von Corticosteroiden

Während 7 Tagen täglich Injektion bzw. Verfütterung von Corticosteroiden. Am 7. Tag intraperitoneal 1 ml trägerfrei $Na_2\,^{35}SO_4$ ($2{,}3 \times 10^5$ cpm). Am 9. Tag Sektion

Verwendete Corticosteroide	Anzahl Versuchstiere	Injektion bzw. Verfütterung	Tägliche Dosis pro Tier	cpm/g Knorpeltrockengewicht	Statistische Sicherung: Unterschied gegenüber den Kontrolltieren
Kontrollen	28	—	—	1540 ± 106	— $\sigma = 560$
Cortison (-azetat) Cortone Merck	13	subkutan (Suspension)	3,0 mg	945 ± 118	gesichert $P > 0{,}01$ $\sigma = 425$
Hydrocortison (-azetat) Cortisol Organon	14	subkutan (Suspension)	2,0 mg	1550 ± 152	Kein Unterschied $\sigma = 570$
Prednisolon (Na-tetrahydro-phthalicum) Ultracorten H Ciba	16	subkutan (Lösung)	0,5 mg	1710 ± 220	nicht gesichert $P = 0{,}5$ $\sigma = 887$
6α-Methyl-Prednisolon Suprametil Geistlich	10	oral (Tabletten)	0,5 mg	810 ± 94	gesichert $P > 0{,}01$ $\sigma = 297$
9α-fluoro-16α-hydroxy-Prednisolon = Triamcinolon, Ledercort Lederle	10	oral (Tabletten)	0,5 mg	1060 ± 146	gesichert $P = 0{,}01$ $\sigma = 460$
9α-fluoro-16α-methyl-Prednisolon = Dexamethason, Decadron Merck	10	subkutan (Lösung)	0,1 mg	940 ± 103	gesichert $P > 0{,}01$ $\sigma = 325$

Methode: Im Laufe der Monate Juli–Dezember 1959 führten wir vier Versuchsreihen mit 250–350 g schweren, weiblichen Meerschweinchen durch. Abgesehen von den Kontrollen erhielten die Tiere während 7 Tagen einmal täglich die zu prüfenden Corticoide, entweder subkutan injiziert oder einzeln verfüttert. Die tägliche Menge war entsprechend den in der Humanmedizin gebräuchlichen Dosen abgestuft: zum Beispiel Hydrocortison $^1/_3$mal schwächer als Cortison, Prednisolon 6mal schwächer, Dexamethason 30mal schwächer usw. (vgl. Tab.). Am 7. Tag erhielten alle Tiere, inkl. die Kontrollen, zusätzlich 1 ml radioaktive, trägerfreie Natriumsulfat-Lösung (^{35}S) intraperitoneal injiziert ($2{,}3 \times 10^5$ cpm). Zwei Tage danach erfolgte die Sektion. Insgesamt kamen 28 Kontrolltiere und 73 Corticoid-Tiere zur Untersuchung. Für jedes Tier wurden die präparierten Kostalknorpel einzeln weiter verarbeitet. Nach Aufschliessen des Knorpelmaterials mit der Methode nach Bailey[11] und Zugabe von 0,25 ml normaler Natriumsulfat-Lösung als Trägersubstanz wurde der Gesamtschwefel durch Bariumchlorid gefällt. Die Radioaktivität (cpm) des Sulfatniederschlages wurde bestimmt, entsprechend aufgewertet (Halbwertszeit von ^{35}S = 87 Tage) und auf 1 g Knorpeltrockengewicht umgerechnet.

Obwohl in den vier Versuchen gleiche Bedingungen vorlagen, wiesen die Mittelwerte der 6–8 Kontrolltiere jeder Reihe doch gewisse Unterschiede auf. Um nun die cpm-Werte der Corticoid-Gruppen nicht nur innerhalb ihrer eigenen Versuchsreihen mit dem Kontroll-Mittelwert in Vergleich setzen zu können, war es nötig, die für die Kontrolltiere erhaltenen cpm-Werte auf den Mittelwert einer einzelnen Versuchsreihe umzurechnen und danach auch die Werte der einzelnen Corticoid-Gruppen mit dem entsprechenden Rechnungsfaktor zu multiplizieren, bzw. zu dividieren. In der Tabelle ist das so erhaltene Zahlenmaterial niedergelegt.

Ergebnis: Die sechs von uns geprüften Glucocorticoide können in ihrer Wirkung in zwei deutlich unterscheidbare Gruppen eingeteilt werden. Vier der Corticoide ergaben eine statistisch stark gesicherte Hemmung des ^{35}S-Einbaus in den Kostalknorpel, während bei den beiden anderen der ^{35}S-Gehalt des Knorpelmaterials mit jenem der Kontrolltiere übereinstimmte (Tabelle). Es sind dies das natürlicherweise im Organismus vorkommende Hydrocortison und das sich nur durch eine Doppelbindung zwischen C1 und C2 von diesem unterscheidende Prednisolon. Eine Erhöhung der Schwefelaufnahme unter Hydrocortison-Einfluss, wie dies von Clark und Umbreit[6] in ihren *in-vitro*-Versuchen beobachtet werden konnte, scheint im lebenden Tier nicht aufzutreten. Die vier hemmenden Glucocorticoide dagegen weisen im Vergleich zu Hydrocortison bestimmte chemische Veränderungen auf: Cortison C11-Ketogruppe, Methyl-prednisolon 6α-CH_3-Gruppe, Triamcinolon 9α-Fluor-16α-OH-Gruppe, Dexamethason 9α-Fluor-16α-CH_3-Gruppe.

Ruth Lotmar

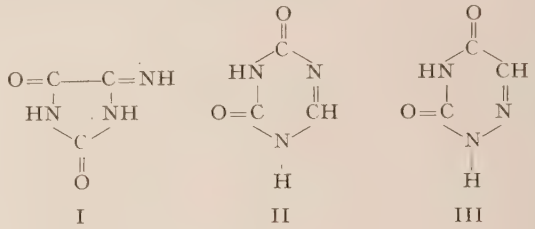
Rheumaklinik und Institut für Physikalische Therapie der Universität Zürich, 24. Februar 1960.

Summary

The uptake of ^{35}S, in the chondroitin sulfate of the costal cartilage of guinea pigs, is inhibited by cortisone, methyl-prednisolon, triamcinolon, and dexamethason. No inhibition could be seen under the influence of the natural adrenal hormone hydrocortisone and its nearest relation, prednisolon.

Antagonism between 5-Azauracil and Pyrimidine Precursors of Ribonucleic Acids in *Escherichia coli*

5-Azauracil was known in the older literature under the name of allantoxaidine[1–3], and was originally considered to be 2, 5-dioxo-4-imino-imidazolidine (I). The correct formulation of allantoxaidine structure, however, was arrived at later, and it was Brandenberger and Brandenberger[4], Canellakis and Cohen[5], and most recently Gut *et al.*[6], who showed that allantoxaidine is actually 2, 4-dioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydro-1, 3, 5-triazine (II). The results presented in this communication confirm the last-named structure.



I II III

In analogy to 6-azauracil (III) allantoxaidine was later[7] named 5-azauracil.

Biological effects of 5-azauracil were studied by Hakala, Law, and Welch, who found that 5-azauracil in the doses applied does not affect the growth of experimental lymphoma L 1210. On the other hand, Elion *et al.*[8] found that 5-azauracil acts as a powerful inhibitor of growth of adenocarcinoma 755, at non-toxic doses.

As far as the antibacterial effect of 5-azauracil is concerned, no data are available in the existing literature. Therefore, we attempted to study the inhibitory effect of 5-azauracil on the growth of *E. coli* B and devoted our attention to the antagonistic relation of 5-azauracil to a number of purine and pyrimidine components of nucleic acids.

Experimental and Results. The inhibition of growth of *E. coli* B, and the antagonism of 5-azauracil toward purine and pyrimidine derivatives, were studied in a synthetic medium containing glucose and inorganic salts[9]. The bacteria were grown in 10 ml of medium in test-tubes provided with Kapsenberg stoppers at 37°C for 15 h, analogously as in previous work[9]. The growth was estimated turbidimetrically at 575 mμ.

5-Azauracil used in the work described was prepared by a modification[6] of Hartman's method[10].

[1] H. Biltz and R. Robl, Ber. deutsch. chem. Ges. *53*, 1967 (1920).
[2] C. S. Venable, J. Amer. chem. Soc. *40*, 1099 (1918).
[3] F. J. Moore and R. M. Thomas, J. Amer. chem. Soc. *40*, 1120 (1918).
[4] H. Brandenberger and R. H. Brandenberger, Helv. chim. Acta *37*, 2207 (1954).
[5] E. S. Canellakis and P. P. Cohen, J. biol. Chem. *213*, 379 (1955).
[6] J. Gut *et al.*, in press.
[7] M. T. Hakala, L. W. Law, and A. D. Welch, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. *2*, 113 (1956).
[8] G. B. Elion, S. Bieber, H. Nathan, and G. H. Hitchings, Cancer Res. *18*, 802 (1958).
[9] J. Škoda and F. Šorm, Coll. czech. chem. Comm. *21*, 1331 (1956).
[10] S. C. Hartman and J. Fellig, J. Amer. chem. Soc. *77*, 1051 (1955).
[11] F. Šorm and J. Škoda, Coll. czech. chem. Comm. *21*, 487 (1956).
[12] A. M. Moore and J. B. Boylen, Arch. Biochem. Biophys. *54*, 312 (1955).

It was found that a 50% inhibition of growth of *E. coli* B by 5-azauracil is achieved at a concentration of $1{\cdot}25 \times 10^{-4}$ *M*. The relationship of growth inhibition to the concentration of the inhibitor has a different character with 5-azauracil than with 6-azauracil. It was further found that, in the presence of a subbacteriostatic concentration of 5-azauracil, no formation of elongated cellular forms of bacteria takes place, in contrast to what is encountered with 6-azauracil[11]. This finding indicates the existence of a different mechanism of inhibition for 6- and 5-azauracil toward *E. coli*. The *E. coli* cells were found to acquire very rapidly a resistance toward 5-azauracil.

The ability of some pyrimidine derivatives to counteract the growth-inhibition effect of 5-azauracil follows from the data of the Table. Thus it may be seen that 5-azauracil represents for *E. coli* an antimetabolite of ribonucleic acid pyrimidine bases, or rather of their ribosides. Orotic acid, which is known to be a precursor of pyrimidine bases of nucleic acids in numerous biological systems, does not counteract the inhibitory effect of 5-azauracil. This observation can be explained by the inability of *E. coli* cells to utilize exogenous orotic acid for synthesis of pyrimidine bases of nucleic acids, as was shown[12] for the *E. coli* strain 63–86.

The effect of metabolites of nucleic acids on the growth inhibition o *E. coli* B caused by 5-azauracil. 5-Azauracil concentration was 5×10^{-4} M, that of the metabolites also 5×10^{-4} M. The values represent the growth of the culture expressed in % culture density as obtained in the absence of inhibitor

Metabolite added to the medium along with the inhibitor	Growth % control
Adenine	0
Guanine	1
Uracil	114
Cytosine	111
Thymine	2
Orotic acid	0
Adenosine	1
Guanosine	0
Uridine	98
Cytidine	104
Deoxyuridine	85
Deoxycytidine	84
Thymidine	60

The antagonistic effect of deoxyuridine and deoxycytidine can be explained by an utilization of their bases. It is of interest, however, to note the antagonistic effect of thymidine. *E. coli* cells apparently transform thymidine to pyrimidine precursors of ribonucleic acids while thymine cannot be utilized for this purpose.

This work and further experiments will be described in detail in the Collection of Czechoslovak Chemical Communications.

F. Šorm, J. Škoda, and J. Kára

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague, December 31, 1959.

Zusammenfassung

Es wurde ein inhibierender Effekt von 5-Azauracil auf Kulturen von *Escherichia coli* B festgestellt, der durch die Anwesenheit von Uracil, Cytosin und ihren Ribosiden aufgehoben wird. Desoxyuridin, Desoxycytidin und Thymidin beseitigen teilweise die hemmende Wirkung von 5-Azauracil.

Adsorption and Active Transport

In a number of ion transport studies it has been found that the kinetic data obtained conform to the Michaelis-Menten treatment of enzyme action[1]. This proved especially valuable in relation to the type of competition exhibited by ions not normally involved in active transport. Thus Epstein and Hagen were able to conclude that in barley roots one type of binding site is specific for K, Rb, and Cs ions since these ions exhibit a competitive type of inhibition, the three as a group differing from Na or Li ions in being bound preferentially. The high degree of specificity found in their study is reflected in the differential uptake of K ions from a medium in which Na ions are preponderant.

Current transport hypotheses localizing the active processes in the cell membrane often seem to imply that the applicability of the Michaelis-Menten treatment indicates the presence of carrier mechanisms. Since the success of this treatment is due solely to the fact that the ion uptake follows a saturation-type kinetics, the same data can be taken as indicating the binding of K or other competing ions onto labile, poison sensitive intracellular adsorption sites. This view is supported below by showing the Michaelis-Menten equation to be formally identical with the Langmuir adsorption formula, thus extending the demonstration of the identity of the latter with the law of mass action[2].

Given a reaction $A + B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} C$ where A, B, and C represent molecular species and k_1 and k_{-1} the forward and backward reaction rate constants, one obtains the following expression for the rate of formation of C, the concentrations of A, B, and C being represented by small case letters: $dc/dt = k_1 (a - c) (b - c) - k_{-1} c$.

At equilibrium $dc/dt = 0$ and $(a - c) (b - c)/c = k_{-1}/k_1 = K$. K represents the dissociation constant of the molecular species C, its reciprocal being the equilibrium constant, a measure of the affinity between A and B.

If $a \ll b$, then $(b - c)$ can be taken as approximately equal to b and constant, the formula reducing to $b(a - c)/c = K$, or $c = ab/Kb$, or in the linear form $1/c = 1/b\ K/a + 1/a$.

If in this simple kinetic system one regards A as the enzyme, B its substrate, C denoting the emzyme-substrate complex, the expression represents the Michaelis-Menten treatment applicable to the limiting case when the enzyme-substrate complex does not react with a second substrate to yield the free enzyme and the products, as in the case when the enzyme reacts with an inhibitor.

If on the other hand one regards c as the amount of adsorbed substance in moles per unit volume (i. e. bound to adsorption sites) and a as the total concentration of adsorption sites, also in moles per unit volume, b retaining its original meaning of substrate concentration, then the formula represents a linear transformation of Langmuir's adsorption isotherm.

[1] E. Epstein and C. H. Hagen, Plant Physiol. *27*, 457 (1952). – E. Epstein and J. E. Leggett, Amer. J. Bot. *47*, 785 (1954). – E. Epstein, Plant Physiol. *30*, 529 (1955). – A. Rothstein, in *Electrolytes in Biological Systems* (A. M. Shanes Edit., Amer. Physiol. Soc., Washington, D. C. 1955), p. 65. – E. J. Conway and F. Duggan, Biochem. J. *69*, 265 (1958). – A. Rothstein and M. Bruce, J. cell. comp. Physiol. *51*, 145 (1958).

[2] D. I. Hitchcock, J. Amer. chem. Soc. *48*, 2870 (1926).

[3] W. F. Widdas, J. Physiol., London *118*, 23 (1952). – W. F. Widdas, J. Physiol., London *125*, 163 (1954). – Hisashi Sanui and N. Pace, J. gen. Physiol. *42*, 1325 (1959). – A. S. Troschin, *Das Problem der Zellpermeabilität* (Gustav Fischer Verlag, Jena 1958).

This simple derivation is intended to point out adsorption as the essential feature of intracellular ion accumulation studies in which the Michaelis-Menten treatment was used. These studies are thus brought in line with other investigations in which the Langmuir's adsorption formula was found to apply both in the case of living and non living systems[3].

I wish to thank Drs. G. Ungar and B. W. Zweifach for their kind interest and encouragement.

E. Aschheim

Department of Pathology, New York University, Bellevue Medical Center, New York, February 5, 1960.

Résumé

On démontre l'identité formelle de l'équation de Langmuir (pour l'adsorption) et de celle de Michaelis-Menten, toutes deux fondées sur la loi de «mass action». Cette démonstration justifie la vue d'après laquelle l'accumulation des ions par les cellules vivantes selon la loi de Michaelis-Menten représente une liaison d'adsorption au niveau intracellulaire. Les centres d'adsorption, qui peuvent être inactivés par divers poisons chimiques, dépendraient du métabolisme de la cellule. Cette conception offre une alternative à l'hypothèse du «carrier» qui a été souvent postulée.

Über die Beeinträchtigung der Wirkung von Spindelgiften in der Zellkultur durch menschliches Serum sowie durch Seren verschiedener Tierspezies

Über die Beeinflussung der Wirksamkeit von Pharmaka durch Serumproteine liegen in der Literatur zahlreiche Beobachtungen vor. In den meisten Fällen handelt es sich dabei nicht um eine Wirkung der Proteine auf das biologische Testobjekt, sondern um eine Bindung der betreffenden Wirkstoffe an Proteine, wodurch ihre Wirkung abgeschwächt oder der Wirkungseintritt verzögert wird. Noch relativ wenig sind aber die Unterschiede, die hinsichtlich dieser Bindungsfähigkeit zwischen den Seren verschiedener Tierarten bestehen, untersucht worden. Im folgenden soll kurz über eine Beobachtung auf diesem Gebiet berichtet werden.

Bei der Prüfung der zytostatischen Wirkung von Podophyllinabkömmlingen in der Gewebekultur verwendeten wir Fibroblasten von Hühnerembryonen und ein Nährmedium, das neben Rinderamnionflüssigkeit und Rinderembryoextrakt auch 5% Serum enthält[1]. Podophyllin bewirkt, wie Colchicin, eine Arretierung der Mitosen in der Metaphase, wodurch es zu einer Anhäufung der frühen und zu einer Abnahme der späten Mitosephasen kommt. Diese Wirkung ist in der Gewebekultur leicht zu beobachten und auch quantitativ zu erfassen, da das vollständige Verschwinden der Ana- und Telophasen einen gut definierten Endpunkt darstellt. Wir machten nun die Beobachtung, dass bei Verwendung von 5% Menschenserum andere Werte als mit pferdeserumhaltigem Medium erhalten wurden. Die meisten Untersuchungen wurden mit N-Dodecylpodophyllsäurehydrazid durchgeführt, und es ergab sich als Durchschnitt von 11 Versuchen, dass von diesem Präparat beim Arbeiten in menschenserumhaltigem Medium 3,05($\pm$ 0,30)mal höhere Konzentrationen nötig sind als mit pferdeserumhaltigem Medium, um den gleichen Effekt, nämlich die Arretierung aller Mitosen, zu erzielen. Der Unterschied ist nach dem t-Test statistisch hoch signifikant ($p < 0{,}001$). Die voll antimitotisch wirksame Konzentration dieser Substanz liegt in unserer Versuchsanordnung bei $10^{-6{,}6}$ (Menschenserum), bzw. bei $10^{-7{,}1}$ (Pferdeserum). Beim von uns verwendeten Menschenserum handelt es sich um eine Mischung vieler Seren (Standardserum des Schweiz. Roten Kreuzes), die sowohl in getrockneter als auch in flüssiger Form identische Resultate ergab. Das Pferdeserum stammte von einzelnen Tieren und wurde von zwei verschiedenen Quellen bezogen. Ein Vergleich zwischen pferdeserumhaltigem und serumfreiem Medium zeigte, dass auch Pferdeserum die Wirkung der Podophyllinderivate abschwächt. In unserer Versuchsanordnung war mit Pferdeserum die doppelte Menge Dodecylpodophyllsäurehydrazid nötig, um eine gleiche Wirkung wie im serumfreien Medium zu erzielen.

Mit derselben Substanz wurden dann noch andere Seren in gleicher Weise, aber in einer geringeren Zahl von Experimenten untersucht. Menschliches Nabelschnurmischserum ergab gleiche Resultate wie das von Erwachsenen stammende Standardserum. Die andern geprüften Seren (von Rind, Meerschweinchen, Ratte, Maus, Hahn) hingegen verhielten sich ungefähr gleich wie Pferdeserum, schwächten also die Podophyllinwirkung bedeutend weniger stark ab als Menschenserum. Seren von verschiedenen Kaninchen ergaben stark unterschiedliche Resultate. Alle Seren wurden in nichtinaktiviertem Zustand verwendet. Ein Vergleich beim Pferde- und Menschenserum zeigte jedoch, dass Inaktivierung (30 min 56°C) auf die hier untersuchte Serumeigenschaft keinen Einfluss hat.

Eine Reihe anderer Podophyllinderivate zeigte denselben, durch die Verwendung von Menschen- bzw. Pferdeserum verursachten Wirkungsunterschied wie das oben erwähnte Dodecylhydrazid. Hingegen konnte kein solcher Unterschied festgestellt werden beim Colchicinderivat Demecolcin[3]. Im Mittel von 7 Versuchen war hier mit menschenserumhaltigem Medium 1,016mal mehr Demecolcin nötig als im Medium mit Pferdeserum, ein Wert, dessen Abweichen von 1,00 natürlich noch weit innerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegt. Da Fibroblasten von Hühnerembryonen in Medium mit Menschen- oder Pferdeserum etwa gleich gut wandern und sich vermehren, liegt der Gedanke nahe, für die unterschiedliche Wirkung der Podophyllinderivate in menschen- bzw. pferdeserumhaltigen Medien eine verschieden starke Bindung dieser Stoffe an die Proteine des Menschen- bzw. Pferdeserums verantwortlich zu machen. Diese Vermutung konnte durch Dialyseversuche bestätigt werden.

Ein bekanntes Beispiel für die Wirkstoffbeeinflussung durch Serumproteine sind die Herzglykoside. In dieser Stoffgruppe wurde gezeigt, dass kleine Verschiebungen

[1] A. Cerletti, H. Emmenegger und H. Stähelin, Actualités pharmacol. *12*, 103 (1959).

[2] Freundlicherweise vom Frauenspital Basel zur Verfügung gestellt.

[3] Verwendet wurde das Präparat Colcemid, CIBA.

[4] E. Suter, Helv. physiol. pharmacol. Acta *2*, 211 (1944).

[5] E. Rothlin und R. Bircher, Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. *5*, 457 (1954).

[6] R. A. Hoekstra, Arch. exp. Path. Pharmakol. *162*, 649 (1931).

[7] A. Farah, J. Pharmacol. exp. Ther. *83*, 143 (1945).

[8] E. K. Oyakawa und B. H. Levedahl, Arch. Biochem. *74*, 17 (1958).

[9] J. Avigan, Cancer Res. *19*, 831 (1959).

[10] J. V. Taggart, Amer. J. Physiol. *167*, 248 (1951).

[11] E. Rothlin, Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich *40*, 195 (1945).

[12] A. Goldstein, Pharmacol. Rev. *1*, 102 (1949).

in der Zahl und Stellung der OH-Gruppen im Aglykongerüst für die verschieden starke bzw. fehlende Bindung der Glykoside an Serumalbumin verantwortlich zu machen sind[4,5]. Beim Podophyllin liegen ebenfalls Anhaltspunkte für einen Einfluss der OH-Gruppe auf die Serumbindung vor, indem wir beim β-Peltatinsäuredodecylhydrazid, welches sich vom oben erwähnten Dodecylpodophyllsäurehydrazid nur durch die Stellung der OH-Gruppe unterscheidet, keinen Unterschied fanden zwischen der Wirkung im Medium mit Menschenserum und derjenigen im Medium mit Pferdeserum. Qualitativ wirkt das Peltatinsäurehydrazid in der Fibroblastenkultur gleich wie das Podophyllsäurehydrazid. Ebenfalls bei den Herzglykosiden wurde darauf hingewiesen, dass hinsichtlich Bindungsfähigkeit Unterschiede zwischen den Seren verschiedener Spezies bestehen[4,6]. Fast immer wurden, sowohl bei den Herzglykosiden als auch bei anderen Substanzen, höhere Bindungswerte für menschliches als für die meisten tierischen Seren (vielleicht mit Ausnahme des Kaninchenserums) gefunden, so zum Beispiel für Digitoxin[4,7], für Testosteron[8], für karzinogene Kohlenwasserstoffe[9] und für *p*-Aminohippurat[10]. Unsere Befunde bei Podophyllinabkömmlingen stehen damit also in Übereinstimmung.

Der Wirkungscharakter von Pharmaka wird zweifellos auch *in vivo* durch die Bindungsfähigkeit des Blutserums stark beeinflusst[11,12]. Es ist daher zu vermuten, dass allein schon die von uns beobachteten Differenzen zwischen verschiedenen Seren Speziesunterschiede bezüglich Wirkungsstärke und -charakter der geprüften Stoffe erklären könnten.

H. Stähelin

Pharmakologisches Laboratorium SANDOZ AG., Basel, 25. April 1960.

Summary

Chick embryo fibroblasts, cultivated *in vitro*, require higher concentrations of podophyllotoxin derivatives for complete mitotic arrest when the medium contains human adult or cord serum than when it contains horse, bovine, guinea pig, rat, mouse, or cock serum. This difference is due to a higher binding capacity of human serum for these compounds. No such difference was found with a colchicine and a peltatin derivative.

Precisazioni sul Nucleolonema[1]

Molto di recente Gonzalez-Ramirez[2], in seguito ad osservazioni compiute al microscopio elettronico su cellule di organi emopoietici, ha riproposto la questione della struttura e dell'ultrastruttura del nucleolo. Egli, dopo avere ricordato che González-Guzmán aveva sostenuto l'esistenza di granuli argentofili intranucleolari, e che Estable e Sotelo[3,4] avevano ammesso la presenza costante di un filamento avvolto a gomitolo da denominarsi nucleolonema, ha in effetti riconosciuto nel nucleolo, anzichè un gomitolo, delle travate e dei filamenti fra loro anastomizzati «à la manière des alvéoles d'une ruche». Egli pertanto, nel tentativo di conciliare le diverse vedute, si è così espresso: «Si on considère le faible pouvoir de résolution du microscope optique, il n'est pas difficile de comprendre que des mailles irrégulières et parfois peu nombreuses, séparées par des fractions de microns, peuvent apparaître comme un filament plus ou moins pelotonné, comme dans la description d'Estable et Sotelo, tandis que ce que l'imprégnation argentique de González-Guzmán montre comme des grains argentophiles seraient les points d'union des branches de la structure réticulaire, points plus épais que le reste, ou bien la *pars amorpha* contenue entre les mailles du réticule.»

In base alle ricerche abbastanza numerose ormai compiute sull'argomento conviene fare le seguenti precisazioni:

1) Un filamento avvolto a gomitolo, quale hanno creduto di avere individuato Estable e Sotelo coll'impiegare specialmente il metodo di impregnazione argentica di Estable[4], in realtà non esiste[5-7].

2) Tanto l'impregnazione argentica quanto, e ancor meglio, quella platinica[7-9], consentono di svelare nel nucleolo la presenza di granuli (Fig. 2, 3, 4), quali erano stati segnalati non solo da González-Guzmán, ma da numerosi altri autori. L'esistenza di tali granuli, indicati nel passato specialmente come «nucleolini», non è costante, ma legata a determinate condizioni fisico-chimiche del nucleolo. Se essi sono numerosi ed ammassati, con l'argento si verifica spesso una sovraimpregnazione tale da poter simulare un aspetto a gomitolo (Fig. 1), sovraimpregnazione che col platino[8,9] non ha luogo (Fig. 2). Le loro caratteristiche fisiche, rilevabili nei preparati ottenuti con particolari trattamenti, sono del tutto corrispondenti a quelle che si possono osservare nelle cellule allo stato vitale. Si fa notare la loro elevata rifrangenza ed il loro colorito rosso-granato, che vira al giallo col variare dell'angolo di incidenza della luce del microscopio. Tale colorito ripropone la questione delle zone Feulgen-positive endonucleolari. Agli stessi granuli si è ritenuto opportuno dare il termine di nucleolonemali, denominando filamenti nucleolonemali quei collegamenti che molto di sovente si rinvengono fra gli stessi granuli[7]. Alla presenza di questi si accompagna spesso quella di vacuoli (Fig. 4), i quali si differenziano anche per un contenuto con un grado di rifrangenza nettamente inferiore.

3) Al microscopio elettronico, come comprovato ormai da numerose ricerche[10-13], il nucleolo presenta molto di frequente un aspetto a reticolo. Questo non corrisponde al nucleolonema per i seguenti due motivi principali: a) non è impregnabile con i metalli pesanti; b) un reticolo con le sue numerose anastomosi non può costituire l'immagine di sezioni di un filamento avvolto a gomitolo. Il microscopio elettronico rivela, anche nell'ambito delle cellule dello stesso tessuto normale e patologico, nucleoli omogenei (Fig. 5), sì che occorre aderire al concetto espresso

[1] Ricerche sostenute da un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

[2] J. Gonzalez-Ramirez, Rev. Hématol. *14*, 333 (1959).

[3] C. Estable e J. R. Sotelo, Publ. Inst. Inv. Cien. biol. Montevideo *1*, 105 (1951).

[4] C. Estable e J. R. Sotelo, Symp. fine struct. cells Leiden, 170 (1954).

[5] J. H. Tramezzani e V. Valeri, Simp. secr. celular Belo Horizonte, 68 (1955).

[6] M. Hertl, Z. Zellforsch. *46*, 18 (1957).

[7] A. Bolognari, Arch. Zool. Ital. *44*, 53 (1959).

[8] A. Bolognari, Atti Soc. Pelor. Sci. fis. mat. nat. Messina *3*, 113 (1956/57).

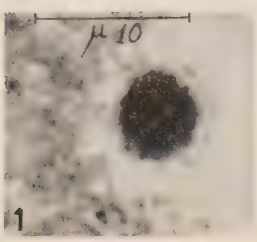
[9] A. Bolognari, M. Albanese e A. Donato, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *35*, 764 (1959).

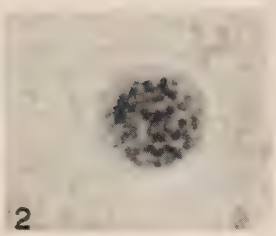
[10] W. Bernhard, A. Bauer, A. Gropp, F. Haguenau e C. Oberling, Exp. cell Res. *9*, 88 (1955).

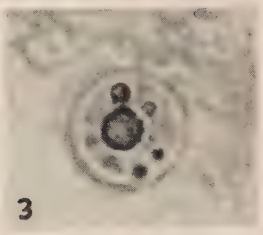
[11] D. W. Fawcett, J. nat. Cancer Inst., 15 Suppl. 1475 (1955).

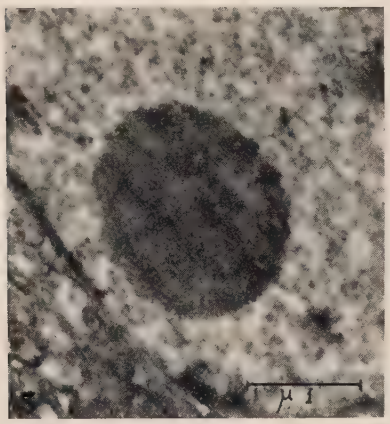
[12] A. F. Howatson and A. W. Ham, Proc. Cancer Res. Conf. *2*, 17 (1957).

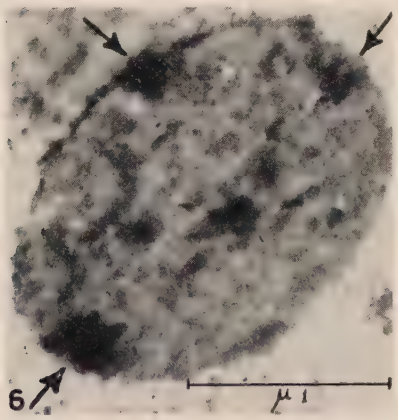
[13] W. Wessel and W. Bernhard, Z. Krebsforsch. *62*, 140 (1957).

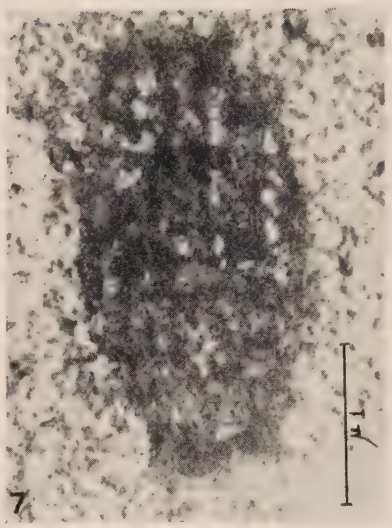












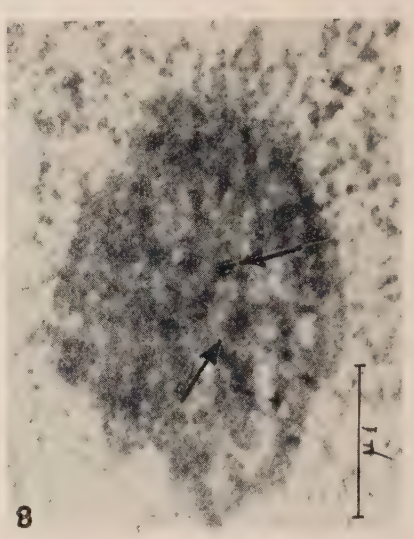


Fig. 1. Nucleolo di ovocita di *Aplysia depilans* dopo impregnazione con nitrato di argento sec. Estable. Notare l'aspetto simile ad un gomitolo. Fig. 2. *Idem* dopo impregnazione con cloruro di platino. Notare i granuli. Fig. 3. Nucleolo di ovocita di *Sphaerechinus granularis* con evidenti granuli rivelati con impregnazione al cloruro di platino. Fig. 4. Nucleolo di ovocita di *Haliotis lamellosa* con evidenti granuli ed un grosso vacuolo (freccia); impregnazione con cloruro di platino. Nelle quattro figure l'ingrandimento è eguale. Fig. 5. Microfotografia elettronica di nucleolo dall'aspetto omogeneo di ovocita di *Patella coerulea*. Fig. 6. *Idem* di nucleolo di ovocita di *Paracentrotus lividus*. Notare gli ammassi (frecce) costituiti dalle più piccole granulazioni. Fig. 7. *Idem* di nucleolo reticolato di cellula del carcinoma di Walker. In esso sono presenti granulazioni scure con un diametro di 200 Å. Fig. 8. *Idem* di nucleolo piuttosto reticolato di cellula del carcinoma di Walker. In esso, oltre le granulazioni di 200Å, sono anche presenti granulazioni molto più piccole con tendenza a formare ammassi rotondeggianti (frecce)

fin dal 1951 da Borysko e Bang[14], per i quali a seconda del momento funzionale, si può avere ora l'aspetto omogeneo ora quello strutturato.

4) Oltre i suddetti aspetti, ne esiste un altro, in verità non tanto frequente, fatta eccezione per gli ovociti e le cellule dei tumori. Esso è dato da ammassi rotondeggianti molto scuri (Fig. 6) di varia dimensione, e distribuiti in punti diversi entro lo stesso nucleolo. Tutti i controlli eseguiti hanno permesso di stabilire che tali ammassi corrispondono ai granuli nucleolonemali[7]. Recenti ricerche[15–17] compiute su cellule infettate con virus hanno permesso di osservare in alcuni nucleoli simili ammassi; rimane da risolvere se si tratta di particelle virali o di granuli nucleolonemali.

5) Dal punto di vista strettamente ultrastrutturale sia i nucleoli omogenei che quelli reticolati si compongono di granulazioni scure aventi per lo più un diametro di 150 Å (se ne sono misurati anche di 100 Å e di 200 Å), ciascuna delle quali circondata da un certo numero di elementi rotondi chiari aventi un diametro pressochè eguale. Il reticolo si costituisce in seguito ad un maggiore addensamento delle suddette granulazioni, secondo delle file variamente orientate e incrociantesi nei modi più diversi (Fig. 7). Gli ammassi scuri, come pure i loro collegamenti, sono dati, invece, da granulazioni molto più piccole, con un diametro da 50 Å in giù. Molto di frequente, e specialmente negli ovociti in accrescimento e nei tumori, è possibile riscontrare, durante una fase più o meno lunga, la coesistenza dei due tipi di granulazioni (Fig. 8) con relative manifestazioni strutturali. Di esse quelle più grandi sono con ogni probabilità l'espressione di complessi macromolecolari di ribonucleoproteine. Quando esiste la cromatina associata (negli ovociti in genere nulla sta ad indicarne la presenza[7,18]), è possibile rinvenire lungo la superficie dei nucleoli dei sottilissimi filamenti spiralati, che sembrano prolungarsi per un certo tratto entro di essi.

[14] E. Borysko and F. B. Bang, Bull. John Hopkins Hosp. *89*, 468 (1951).

[15] P. Tournier, F. Cathala e W. Bernhard, Pr. méd. *52*, 1229 (1957).

[16] W. Bernhard, H. L. Febvre e R. Cramer, C. R. Acad. Sci., Paris *249*, 483 (1959).

[17] R. Dourmashkin e W. Bernhard, J. ultr. Res. *3*, 11 (1959).

[18] J. A. Serra e A. Queiroz Lopes, Portug. Acta biol. [A] *1*, 51 (1945).

[19] A. Bolognari, Nature *183*, 1136 (1959).

In base ai fatti sopra riportati, quanto proposto da Gonzalez-Ramirez per conciliare le diverse vedute sulle strutture del nucleolo, non è accettabile, e ciò specialmente tenuto conto della mutevolezza delle strutture e delle ultrastrutture, anche nell'ambito di uno stesso nucleolo in relazione ai vari momenti funzionali. In generale due principali funzionalità sono state riscontrate[7], una relativa alle granulazioni più grandi, una a quelle più piccole, funzionalità che, specialmente negli ovociti mononucleolati, hanno la loro esplicazione rispettivamente nella fase iniziale e nella fase finale di tutto lo sviluppo ovocitario. In una specie (*Patella coerulea*) con ovociti polinucleolati le due funzionalità si esplicano in due tipi distinti di nucleolo: il nucleolo primario con granulazioni più grandi (di 150 Å di diametro) e senza granuli nucleolonemali, e gli anfinucleoli con granulazioni più piccole (da 15 a 50 Å di diametro) e con granuli nucleolonemali[7,19]. Infine è bene far presente l'inopportunità di continuare a denominare nucleolonema il reticolo endonucleolare, che, come sopra detto, nulla ha a che vedere con la struttura che Estable e Sotelo hanno erroneamente creduto di avere individuato.

Le osservazioni al microscopio elettronico, cui in parte si fa riferimento sopra, sono state compiute presso il Centro di Microscopia elettronica dell'Università di Padova.

A. Bolognari

Istituto di Zoologia e di Anatomia comparata, Università di Messina (Italia), il 5 febbraio 1960.

Résumé

On donne certaines précisions en ce qui concerne le nucléolonema, qui en fait n'existe pas sous forme d'un peloton et qui ne correspond pas au réticule endonucléolaire décelé au microscope électronique. Dans le nucléole on peut reconnaître surtout deux formes d'éléments ultrastructuraux, c'est-à-dire les plus grandes granulations (environ 150 Å de diamètre), qui peuvent donner lieu au réticule, et celles plus petites, dont les accumulations correspondent aux granules nucléolonémales. A ces types de granulations il faut assigner deux rôles principaux.

Renal Tubular Transport of Sodium During Sodium Chloride and Sodium Bicarbonate Loadings in the Normal Dog

Pitts and Lotspeich[1] have demonstrated that bicarbonate reabsorption, expressed in *mM*/l of glomerular filtrate, remained constant when plasma bicarbonate concentration was increased above the threshold value of 26–28 *mM*/l by sodium bicarbonate infusion in the normal dog. No data have been published concerning the tubular reabsorption of sodium in experiments involving hypernatremia induced by $NaHCO_3$ loading. From current view on the $Na^+ \rightleftarrows H^+$ exchange mechanism, one would anticipate the tubular reabsorption of sodium to remain similarly constant if plasma sodium concentration was increased by $NaHCO_3$ infusion.

Data obtained in NaCl loading experiments concerning the influence of increases in sodium and chloride plasma concentrations on their tubular reabsorption are more conflicting. The studies of Hare and Philips[2], and of Baldwin, Kahana, and Clarke[3], seem to demonstrate that sodium and chloride reabsorption rates by the tubules rise linearly with their plasma concentrations. On the other hand, Levy and Ankeney[4], Selkurt and Post[5], Green and Farah[6], and Wesson and Anslow[7] did not observe such a relationship.

These discrepancies led us to reinvestigate sodium tubular reabsorption during hypernatremia induced by NaCl and $NaHCO_3$ loadings in the normal dog.

Methods. The sodium salts were infused in isotonic or hypertonic solutions after the injection of suitable priming doses sufficient to induce frank sodium excretion (over 5.0 *mM* Na/l of glomerular filtrate). In 50 experiments plasma sodium concentration was maintained constant during 60–120 min by sustaining infusion of the sodium salt. In 11 experiments (5 with $NaHCO_3$ and 6 with NaCl) plasma sodium concentration was raised by 3 or 4 successive priming doses of sodium salt so that tubular reabsorption rate could be studied in the course of the same experiment at different plasma concentration levels.

1. *$NaHCO_3$ loading experiments.* 29 experiments were performed on 17 female dogs weighing between 12 and 28 kg. Sodium and bicarbonate reabsorption rates were calculated by the use of the exogenous creatinine clearance as a measure of the glomerular filtration rate (GFR). Hypernatremia was induced by priming doses of 150 to 250 *mM* $NaHCO_3$, and this state was further maintained by a sustaining infusion of isotonic $NaHCO_3$ (1.2–1.8 *mM* $NaHCO_3$/min). 134 anaerobic collection periods, ranging from 8–12 min, were secured during these experiments using the conventional clearance technique.

2. *NaCl loading experiments.* 32 experiments were performed on 10 dogs weighing 13–27 kg. Sodium and chloride reabsorption rates were estimated as in $NaHCO_3$ experiments. Hypernatremia was induced by priming doses of 100–250 *mM* NaCl followed by 1–2% NaCl infusion (1.5–3.0 *mM* NaCl/min). 161 urine collection periods were obtained during these experiments.

Results. It has been repeatedly demonstrated[7–10] that tubular reabsorption rates of sodium, chloride, and bicarbonate were markedly influenced by GFR changes. When GFR increases in the course of saline infusion, electrolyte tubular reabsorption rate rises proportionally so that transport rate values do not change when they are expressed in *mM*/l of glomerular filtrate. On the contrary, drops in GFR are not accompanied by changes in absolute tubular reabsorption rates. It follows that in such conditions tubular reabsorption rates increase when they are expressed in *mM*/l of glomerular filtrate.

The influence of GFR changes on the tubular reabsorption rates of the electrolytes made necessary the exclusion of some data from our results. We have deliberately omitted periods involving a drop of more than 5% in GFR in the course of a given experiment. The data to be presented are based on 295 urine collection periods.

[1] R. F. Pitts and W. D. Lotspeich, Amer. J. Physiol. *147*, 138 (1946).

[2] R. S. Hare and D. M. Philips, Amer. J. Physiol. *140*, 334 (1943).

[3] D. Baldwin, E. M. Kahana, and R. C. Clarke, Amer. J. Physiol. *162*, 655 (1950).

[4] M. N. Levy and J. L. Ankeney, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *79*, 491 (1952).

[5] E. E. Selkurt and R. S. Post, Amer. J. Physiol. *162*, 639 (1950).

[6] D. M. Green and A. Farah, Amer. J. Physiol. *158*, 444 (1949).

[7] L. G. Wesson, Jr. and W. P. Anslow, Jr., Amer. J. Physiol. *180*, 237 (1955).

[8] W. D. Lotspeich, R. C. Swan, and R. F. Pitts, Amer. J. Physiol. *148*, 445 (1947).

[9] D. D. Thompson and R. F. Pitts, Amer. J. Physiol. *168*, 490 (1952).

[10] D. D. Thompson and M. J. Barrett, Amer. J. Physiol. *176*, 201 (1954).

1. *NaCl loading experiments.* Figure 1 shows tubular reabsorption rates for sodium (open circles), and for chloride (black circles), expressed in *mM*/l of glomerular filtrate, plotted with their respective plasma concentration values. It is readily apparent that the reabsorption rate is rising linearly with increasing plasma concentration for both electrolytes. The equations of the regression lines that can be calculated from all the NaCl data are respectively:

$$\text{NaR/l of GF} = 0.647\ P_{Na} + 32.7 \quad (1)$$

and

$$\text{ClR/l of GF} = 0.570\ P_{Cl} + 47.5 \quad (2)$$

where NaR/l of GF and ClR/l of GF represent reabsorption rates expressed in *mM*/l of glomerular filtrate, and P_{Na} and P_{Cl} plasma concentrations in *mM*/l.

The respective slope of both regression lines is significantly different from zero ($P < 0.001$). Moreover, application of the 't test' to the data used to construct both regression lines shows that their slopes do not differ significantly ($0.40 < P < 0.50$).

2. *$NaHCO_3$ loading experiments.* Figure 2 gives the data obtained during $NaHCO_3$ infusions, plotted as in Figure 1, the open circles representing sodium and the black circles bicarbonate transport rates.

The equations of the regression lines calculated from all the data are:

$$\text{NaR/l of GF} = 0.242\ P_{Na} + 89.2 \quad (3)$$

$$\text{HCO}_3\text{R/l of GF} = 0.154\ P_{HCO_3} + 18.7 \quad (4)$$

Variance analysis shows that the slope of the regression line differs significantly from zero in the case of bicarbonate ($P < 0.001$) but not in the case of sodium ($0.05 < P < 0.10$). On the other hand, 't test' application shows that the slopes do not differ significantly one from each other ($0.4 < P < 0.5$).

The range of sodium plasma concentrations explored during $NaHCO_3$ loading experiments is smaller than for NaCl because, due to severe alkalosis, it is impossible to raise natremia to such high levels with $NaHCO_3$. Nevertheless, comparison with sodium data obtained for a similar range of plasma sodium concentrations (147–169 *mM*/l) shows that the slope of the regression line is significantly different from zero in the case of NaCl ($0.01 < P < 0.02$), but not in the case of $NaHCO_3$ ($0.05 < P < 0.10$).

Discussion. The data obtained in NaCl loading experiments show that sodium and chloride reabsorption rates are intimately linked with the respective concentration of these ions in the glomerular filtrate for the plasma concentrations ranges explored (119–179 *mM*/l for chloride, and 158–232 *mM*/l for sodium).

Equation 1 would indicate that sodium tubular transport is the result of two different processes:

(1) 70–75% of the total transport are related to sodium concentration in the glomerular filtrate;

(2) 25–30% constitute a constant fraction dealing with some 40 *mM* of sodium/l of glomerular filtrate.

It is known that the reabsorption of the sodium fraction combined with bicarbonate is limited by a Tm process of some 26–28 *mM*/l of glomerular filtrate, independent of plasma sodium concentration. It follows that the reabsorption of sodium combined with bicarbonate might constitue the main part of the 25–30% fraction. On the other hand, the fraction of the tubular transport which is a function of natremia would essentially represent sodium combined with chloride in the glomerular filtrate.

Such a conception of the tubular transport of sodium would find support in a recent paper by Malvin, Wilde, Vander, and Sullivan[11]. Using their 'stop-flow' technique, these workers calculated that sodium concentration in the proximal reabsorbate was equal to sodium concentration in the glomerular filtrate for any amount of water reabsorbed in the proximal segment of the nephron. In other words, sodium reabsorption rate is a function of sodium plasma concentration. Our own data further show that a similar phenomenon is taking place for chloride.

Contrastingly, in $NaHCO_3$ loading experiments sodium reabsorption rate reaches a fixed Tm value of some 130 *mM*/l of glomerular filtrate (108–144 *mM*/l). This value could represent the sum of two different processes:

(1) 26–28 *mM* constituted by the $Na^+ \rightleftarrows H^+$ exchange mechanism responsible for bicarbonate reabsorption;

(2) most of the remaining 100 *mM* of the sodium transport would represent NaCl reabsorption as described above; this last fraction of the sodium reabsorption rate is relatively stable.

The slight increase of bicarbonate reabsorption rate observed at high plasma bicarbonate concentration levels is due to the simultaneous decrease of plasma chloride concentration which follows $NaHCO_3$ loading[12, 13]. The

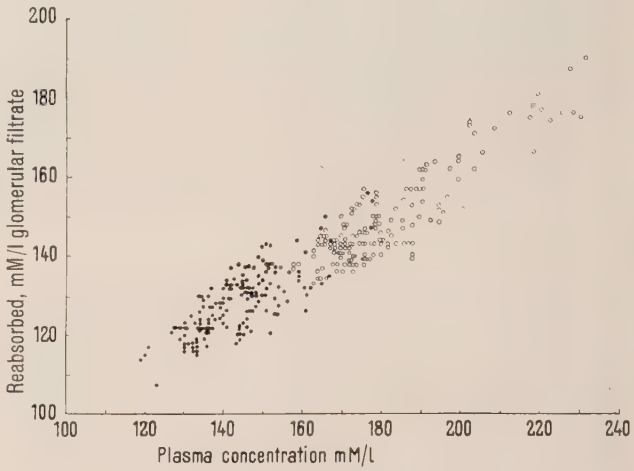


Fig. 1

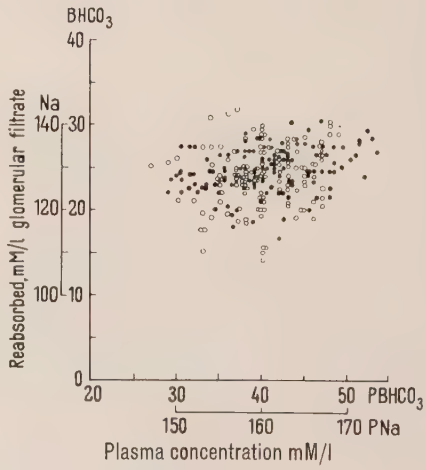


Fig. 2

[11] R. L. Malvin, W. S. Wilde, A. J. Vander, and L. P. Sullivan, Amer. J. Physiol. *195*, 549 (1958).

[12] Ch. Toussaint, M. Telerman, and P. Vereerstraeten, Exper. *14*, 417 (1958).

[13] Ch. Toussaint, M. Telerman, and P. Vereerstraeten, Exper. *15*, 434 (1959).

sligth but definite increments of pCO_2 observed in these experiments would also favour bicarbonate reabsorption.

Ch. Toussaint and P. Vereerstraeten

Laboratoire de Médecine expérimentale, Université libre de Bruxelles et Fondation médicale Reine Elisabeth, Bruxelles (Belgium), March 3, 1960.

Résumé

La réabsorption tubulaire des ions sodium, chlore et bicarbonate a été étudiée au cours de perfusions de NaCl et de $NaHCO_3$ chez le chien normal. 61 expériences, comportant un ensemble de 295 récoltes urinaires, ont été pratiquées sur 21 animaux.

A filtration constante, la réabsorption du sodium exprimée en *mM*/l de filtrat glomérulaire demeure constante lorsque la natrémie est accrue par l'infusion de $NaHCO_3$. Elle est, au contraire, une fonction linéaire de la natrémie lorsque celle-ci est élevée par des perfusions de NaCl.

Dans le premier cas, la réabsorption du sodium s'effectue par un double mécanisme: l'un, lié à la réabsorption du bicarbonate, est fixé par un Tm constant, l'autre, lié à la réabsorption du chlore, dépend de la chlorémie. Lorsque la natrémie est accrue par l'infusion de NaCl, le second mécanisme l'emporte nettement sur le premier. Il apparaît alors une relation évidente entre la natrémie (ou la chlorémie) et la quantité de sodium (ou de chlore) réabsorbée par les tubes rénaux.

Physiology of Intracellular Symbiotes of *Stegobium paniceum* L. with Special Reference to Amino Acid Requirements of the Host

Stegobium paniceum L. is one of the few insects where intracellular symbiosis is somewhat better understood. The yeast-like symbiotes of this beetle supply their host with certain factors of vitamin B-complex and sterol[1,2]. The possible way by which the microbes may be supplying these growth factors has also been later suggested by Gräbner[3]. Recently it has been possible to extend such studies further with reference to amino acid requirements of larvae of this insect species.

Two batches of *Stegobium* larvae, one with and another without symbiotes, were grown on artificial diets containing various combinations of amino acids. The methods of making the basic artificial diet and eliminating the symbiotes by egg-surface sterilization have already been described earlier[2]. The diet consisted of an amino acid mixture 15 parts, starch 85 parts, salt mixture 1 part, cholesterol 2 parts, nucleic acid 0·1 part, and vitamin solution to give a concentration of 25 µg/g of thiamin, riboflavin, nicotinic acid, pyridoxin, pantothenic acid, and 500 µg/g choline, 0·01 µg/g biotin, 4 µg/g folic acid, and 250 µg/g inositol. 30 newly hatched larvae were put on diets deficient in one of the amino acids at a time and growth was observed. The tests were performed in small shell vials containing 2 g of diet.

The results are given in the Table, whence it can be seen that aposymbiotic condition led to an increased demand of the nutrient factors from external dietary source. For the sake of convenience, the various amino acids are so arranged in the Table that the first nine fall under the so-called 'non-essential' category while the remaining ten are under the 'essential'.

Growth of *Stegobium* larvae (with and without symbiotes) on diets lacking in one of the amino acids

Diet lacking in	With symbiotes		Without symbiotes	
	Number of adults out of 30 larvae	Developmental period in days	Number of adults out of 30 lavae	Developmental period in days
'non essential'				
DL-Alanine	29	31–36	10	72–118
DL-Aspartic acid	24	35–57	18	43–118
DL-Cystine	26	32–57	17	52–118
L-Glutamic acid	24	33–57	16	52–118
Glycine	14	64–94	0	–
L-Hydroxyproline	27	33–57	17	35–72
L-Proline	28	31–47	23	40–118
DL-Serine	28	31–50	23	43–108
L-Tyrosine	29	33–50	18	43–108
'essential'				
L-Arginine	2	51–78	0	–
L-Histidine	13	51–93	7	43–108
DL-Isoleucine	11	54–84	0	–
L-Leucine	9	54–88	0	–
L-Lysine	10	42–84	0	–
DL-Methionine	14	35–52	2	72–103
DL-Phenylalanine	18	35–86	0	–
DL-Threonine	7	57–78	0	–
L-Tryptophane	24	46–73	0	–
DL-Valine	13	42–75	0	–
No amino acids	26	38–57	–	–
Casein diet	27	27–37	29	28–40

The dietary deficiency in any one of the 'non-essential' amino acids did not adversely affect the growth of normal *Stegobium* larvae, with the single exception of glycine-deficiency which resulted in increased mortality and prolongation of larval period. Growth was, however, adversely affected when any one of the next 10 'essential' amino acids were omitted from the diet. Their deficiency resulted in marked disturbances in growth and a lower number of larvae completed metamorphosis. Without arginine only 2 larvae could become adults in 51 to 78 days and omission of threonine also proved highly detrimental. Except for tryptophane and probably phenylalanine, all the 'essential' amino acids proved comparatively more vital for larval growth than the first nine listed in the Table.

The reaction of aposymbiotic larvae was, however, entirely different. Individual amino acid deficiency became very much pronounced in the majority of cases, and was characterized by fewer larvae becoming adults and undue prolongation of larval period. In many cases, half-grown larvae survived even up to 118 days, when the experiment

[1] N. C. Pant and G. Fraenkel, Science *112*, 498 (1950).
[2] N. C. Pant and G. Fraenkel, Biol. Bull. *107*, 420 (1954).
[3] K. E. Gräbner, Z. Morph. Ökol. Tiere *41*, 471 (1954).
[4] H. J. Müller, Z. Morph. Ökol. Tiere *44*, 459 (1956).
[5] R. Geigy, L. A. Halff, and V. Kocher, Schweiz. med. Wschr. *83*, 928 (1953).
[6] V. B. Wigglesworth, Tijdschr. Entomol. *95*, 63 (1952).
[7] N. C. Pánt and G. Fraenkel, J. zool. Soc. India *6*, 101 (1954).
[8] L. Toth, Tijdschr. Entomol. *95*, 43 (1952); Arch. Mikrobiol. *18*, 242 (1953).

was discontinued. Among 'non-essential' amino acids, glycine-deficiency resulted in total mortality of larvae, while in other cases fewer larvae became adults in longer time, as compared with normal larvae. Omission of any one 'essential' amino acid made the diet entirely unsuitable for aposymbiotic individuals since, in almost all cases, no or very few larvae became adults. It is therefore evident that the yeast-like micro-organisms supply in varying amounts almost all the ten 'essential' and most of the 'non-essential' amino acids.

The present example of the physiology of symbiotes is probably the first of its type where intracellular micro-organisms have been shown to play an important role in the amino acid requirement of an insect. Aposymbiotic condition is, however, known to cause higher mortality in *Coptosoma*[4], *Triatoma*[5], and *Rhodnius*[6], or to produce additional dietary demands for vitamins of B-complex in *Lasioderma*[1] and *Oryzaephilus*[7]. Tóth[8] has demonstrated fixation of nitrogen in the host body by microbes from atmosphere, or from nitrogenous waste products such as uric acid.

The full details of the investigation will be published elsewhere in due time.

Acknowledgements. Thanks are due to Dr. E. S. Narayanan for his keen interest in the work and for providing us with research facilities.

N. C. Pant, P. Gupta, and J. K. Nayar

Division of Entomology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi (India), July 21, 1959.

Résumé

Les auteurs ont soumis des larves de *Stegobium paniceum* L. à un régime contenant seulement des acides aminés. Ils ont aussi constaté expérimentalement que la levure, de même que les symbiontes intracellulaires fournissent des acides aminés en quantités variables selon l'hôte.

Some Etiological Factors in the Production of Malignant Melanoma

Ghadially and Barker[1] have found that the melanotic tumours produced in hamster skin by repeated applications of 9:10 dimethyl 1:2 benzanthracene arise from a network of melanocytes surrounding some of the pilosebaceous follicles. It is well known that chemical carcinogens penetrate, accumulate, and persist in hair follicles for a considerable period of time and that an early effect of carcinogenic action is disruption of sebaceous glands[2]. It would therefore appear that the peculiar distribution of melanocytes in the hamster skin places these cells in a most vulnerable position for attack by the carcinogen. The fact that similar networks have hitherto not been observed in mouse and rabbit skin explains why hamsters are so prone to the development of melanotic tumours while mice and rabbits are not.

Many large melanotic networks also surround the coarse hair producing giant pilosebaceous follicles situated in the costovertebral spot of the hamster. Repeated painting of the costovertebral spot, however, did not produce melanotic tumours in the spot itself, though many such tumours appeared in the surrounding skin[1]. The most likely explanation of this phenomenon is that the carcinogen was rapidly flushed out by the secretion from these large sebaceous glands.

Whole mount of hamster shin showing network of dendritic melanocytes surrounding pilosebaceous follicles in the region just above and around sebaceous glands. Haematoxylin and eosin × 137

Our experiments on the histogenesis of the hamster melanoma[1] suggest that a close association between melanocytes and the pilosebaceous follicles producing fine hair may be dangerous, while an association between melanocytes and large pilosebaceous follicles producing large coarse hair may not be so dangerous. In man a close association between a large collection of melanocytes and pilosebaceous apparatus, similar to that seen in the hamster, does not occur in normal skin but is sometimes seen in naevi. The hairy mole of man; a well recognised clinical entity, may be considered morphologically similar in certain respects to the costovertebral spot of the hamster for in both these sites we find large coarse hairs, large sebaceous glands, and abundant melanocytes. Since the costovertebral spot is very resistant to the action of chemical carcinogens one might suspect that the same is probably true in the case of the hairy mole of man. Clinical observation supports this idea for malignant changes very rarely occur in the hairy mole[3].

It is now generally accepted that when a malignant melanoma arises in a mole or in normal human skin it is from melanocytes at the dermo-epidermal junction. In this position ultraviolet light in the form of solar radiation

[1] F. N. Ghadially and J. F. Barker, J. Path. Bact. *79*, in press (1960).

[2] V. Sutzeff, E. V. Cowdry, and A. Croninger, Cancer Res. *15*, 637 (1955).

[3] J. Belisario, *Cancer of the Skin* (Butterworth & Co., London 1959), p. 191.

[4] H. O. Lancaster, Lancet *2*, 929 (1955).

[5] H. O. Lancaster, Med. J. Aust. *1*, 1082 (1956).

[6] E. P. Cawley, Arch. Derm. Syph. *65*, 440 (1952).

[7] M. Gordon, Zoologica *35*, 19 (1950).

[8] F. N. Ghadially and M. Gordon, Cancer Res. *17*, 597 (1957).

[9] A. C. Allen, Arch. Derm. Syph., Chicago *69*, 150 (1954).

is more likely to reach and stimulate these cells to melanoma production than chemical carcinogens. Recent studies by LANCASTER[4,5] have drawn attention to the relatively high incidence of malignant melanoma on the exposed part of the body and in geographical locations with more sunlight hours. These studies suggest that solar radiation is a factor in the production of malignant melanomas in man. This however does not exclude the possibility that in some instances chemical carcinogens may be responsible for malignant melanoma production, for there is no reason to suppose that the melanocyte at the dermo-epidermal junction is totally inaccessible to chemical carcinogens, or refractory to such stimulation.

The factors responsible for converting the melanocytes in the skin or the naevus of man into a malignant melanoma are as yet not precisely established but the collective evidence now indicates that endogenous factors such as genetic[6–8] and hormonal[9], and extrinsic factors such as ultraviolet radiations[4,5] and chemical carcinogens may all be involved. It remains for future research to establish the relative importance of these factors in the production of malignant melanomas in man.

F. N. GHADIALLY

Department of Pathology, University of Sheffield (England), January 18, 1960.

Zusammenfassung

Die Bedeutung von Erb- und Hormonalfaktoren bei der Entwicklung des malignen Melanomes wurde vor allem früher hervorgehoben. Es scheint, dass auch karzinogene Stoffe (Chemikalien) und ultraviolette Bestrahlung von wesentlicher Bedeutung sind.

Change of Threshold During Dark Adaptation Measured with Orange and Blue Light in Cats and Rabbits

Recently the change of threshold during dark adaptation has been measured in cats and rabbits by determining the light energy necessary for a constant electroretinographic response after light adaptation with strong and moderate lights (DODT and ELENIUS[1]). Two phases were found in the dark adaptation curves obtained after strong light adaptation, the break occurring on an average after 15 min in the dark in cats and 40 min in rabbits. The electroretinographic dark adaptation curves of cats and rabbits show two phases of change of threshold, and resemble the course of sensory dark adaptation measured in the human peripheral retina, where the initial part of the curve is usually ascribed to the cones and the second part to the rods. In agreement with this theory, KOHLRAUSCH[2] showed that the break in the adaptation curve of the human peripheral retina occurred later and the total change of threshold was smaller if measurements were made with lights of long wavelengths than if they were made with white light or lights of short wavelengths. This effect of the test wavelength on the shape of dark adaptation curve has since been confirmed by using the microelectrode technique in the frog eye (GRANIT[3]) and in the cat (GRANIT[4]; BARLOW, FITZHUGH, and KUFFLER[5]).

The aim of the present experiments was to see if there is a similar change of spectral sensitivity during dark adaptation in the electroretinographically measured dark adaptation curves of cats and rabbits. This problem has become particularly interesting as it has been shown that in cats the maximum of spectral sensitivity (measured electroretinographically) is at 556 mμ when flicker stimulation at high rates (above 30/s) and strong stimuli are used; whereas in rabbits, under the same conditions, the spectral sensitivity curve closely follows the rhodopsin absorption curve (DODT and WALTHER[6]).

In 3 cats and 4 pigmented rabbits the change of threshold during dark adaptation has been measured with white light (Xenon arc) and with orange and blue light (narrow band double interference filters, λ_{max} 605 and 462 mμ). The cats were decerebrated or anesthetized with Evipan. The rabbits were anesthetized with Urethane. Flaxedil was given to all anesthetized animals and they were artificially respirated. The light used for light adaptation and the test light both illuminated the same area (3 cm in diameter) of an opal glass disc placed 15 mm in front of the eye, except in one cat and one rabbit where both beams were focused in the dilated pupil in order to make light adaptation as effective as possible and to facilitate the measurement with colored test lights in the beginning of dark adaptation. The duration of light adaptation was 15 min in all experiments.

Typical results are illustrated in Figure 1 (cat) and Figure 2 (rabbit). Figure 1 shows that in the cat the 'cone phases' of the dark adaptation curves measured with orange light (open triangles) and blue light (open squares) are clearly separated (the curves are made to coincide in full dark adaptation = zero ordinate). This

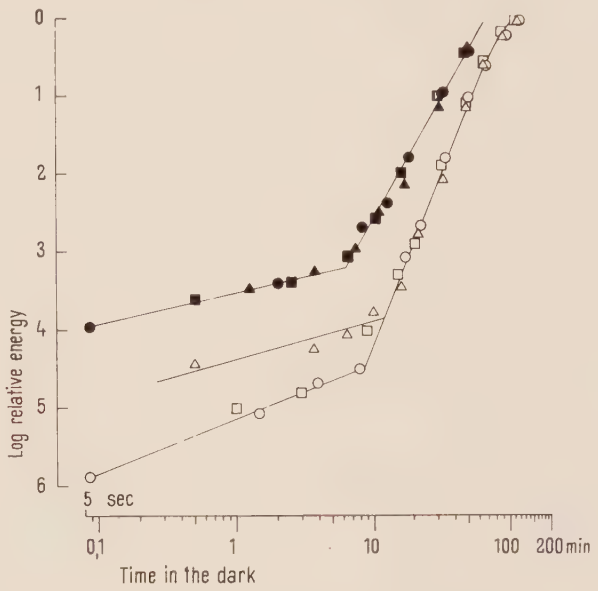


Fig. 1. Cat, Evipan anesthesia, Flaxedil and artificial respiration, pupil dilated with Homatropine and Veritol (Knoll) drops. Dark adaptation curves plotted in log relative energy at threshold (energy necessary for an electroretinogram of constant size, 10 μV b-wave) against log time in the dark. The curves are made to coincide at the threshold preliminary measured in fully (3 h) dark adapted eye. Test light: white (circles), 462 mμ (squares) and 605 mμ (triangles). Light adaptation: white light, duration 15 min, retinal illumination in first light adaptation about 1.05×10^6 Trolands (open symbols), in second light adaptation 0·6 log units weaker light (filled symbols)

[1] E. DODT and V. ELENIUS, The Second Scandinavian Summer Meeting of Biochemistry, Medical Chemistry, Pharmacology, and Physiology, Turku/Åbo (1959).

[2] A. KOHLRAUSCH, Pflüg. Arch. ges. Physiol. *196*, 113 (1922).

[3] R. GRANIT, Acta physiol. scand. *3*, 137 (1941).

[4] R. GRANIT, Acta physiol. scand. *7*, 216 (1944).

[5] H. B. BARLOW, R. FITZHUGH, and S. W. KUFFLER, J. Physiol. *137*, 327 (1957).

[6] E. DODT and J. B. WALTHER, Exper. *14*, 142 (1958); Pflüg. Arch. *266*, 175 (1958).

result was found in all cats examined. In Figure 1 the difference of the thresholds for 462 and 605 mμ is about 0·8 log units at 1 min in the dark. This difference then becomes gradually slightly smaller until, after the break in the curve at about 10 min in the dark, the relative sensitivities for 462 and 605 mμ are practically the same as in the dark adapted state. As calculated from the relative spectral sensitivity measured with fast flicker and with single flash stimulation, the total Purkinje shift in the electroretinographic response of the cat corresponds to a difference in change of relative energy for 462 and 605 mμ of about 1.6 log units (Dodt and Walther[6]). Therefore, the separation of dark adaptation curves of Figure 1 by only 0.8 log units does not correspond to a total Purkinje shift and suggests that there is visual purple activity already before the break in the curve. This view is supported by the experiments where the cat's eye was light adapted with 0.6 log units weaker light. In this case, there was no separation of the 'cone phases' of the dark adaptation curves (Fig. 1, filled symbols). In rabbits, this type of result was found in all animals examined. As illustrated in Figure 2, the break in the rabbit's dark adaptation curve appears later than in the cat.

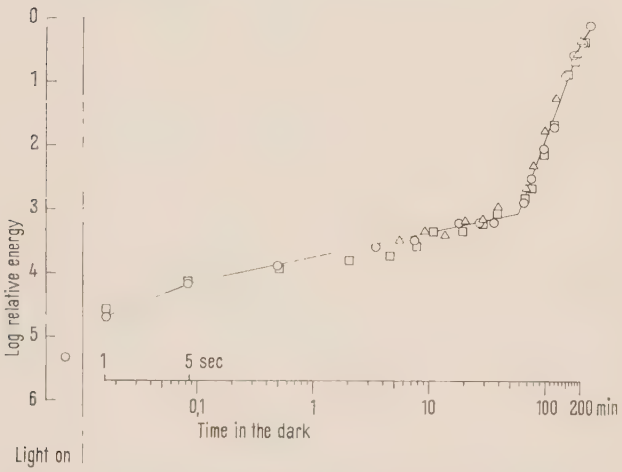


Fig. 2. Rabbit, Urethane anesthesia, Flaxedil and artificial respiration, pupil dilated with Homatropine and Veritol drops. Dark adaptation curve plotted as in Figure 1 but using 25 μV b-wave as a constant index. Preliminary dark adaptation for 4 h. Light adaptation (white light, duration 15 min, retinal illumination about 7.5×10^5 Trolands). Test light: white (circles), 462 mμ (squares) and 605 mμ (triangles)

It must be concluded *either* that the so-called 'cone phase' in the electroretinographic dark-adaptation curve of the cat and rabbit is not mainly due to cones, *or* that in both these species the electroretinographic spectral sensitivity curve can be almost the same when determined by cones as when determined by rods.

The authors are indebted to the Deutsche Forschungsgemeinschaft and the Sigfrid Juselius Stiftelse (Finland) for support of this work.

E. Dodt and V. Elenius

William G. Kerckhoff-Institut der Max-Planck-Gesellschaft Bad Nauheim (Germany), March 23, 1960.

Zusammenfassung

Bei Kaninchen und Katzen wird während Dunkeladaptation die für schwellennahe Antworten konstantei Amplitude im Elektroretinogramm notwendige Lichtenergie bestimmt. Nach Helladaptation (15 min, Reizschwelle am Ende der Helladaptation 10^{-5} bis 10^{-6} der Dunkelkontrolle) zeigt sich in der Dunkeladaptationskurve ein Knick ähnlich dem, der beim Menschen den Übergang der Zapfen- zur Stäbchenadaptation anzeigt. Beim Kaninchen sind die für 462 und 605 mμ gemessenen Reizschwellen vor und nach dem Knick mit den im dunkeladaptierten Zustand erhaltenen Werten identisch. Unter gleichen Bedingungen wird bei der Katze bis zum Knick eine Purkyně-Verschiebung gesehen, jedoch fehlt diese nach Helladaptation an ein schwächeres Licht, während der Knick nachweisbar bleibt.

pH-Dependant Action of NaCl on Isolated Guinea Pig's Ileum

NaCl solutions added to small strips of guinea pig's ileum, isolated in an oxygenated Tyrode bath at 36°C, elicit quite opposite reactions depending on the acid or alkaline pH.

At pH values $\geq 8{\cdot}0$, the administration of small volumes of a 10% solution (in Tyrode) of NaCl (final concentration: $2 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-2}$) is followed by a reversible contracture; by adding graded quantities of NaCl solution, it is possible to obtain a 'characteristic curve' for NaCl; a plot of 1/concentration against 1/effect[1] for NaCl is given in Figure 1.

At pH values $\simeq 5{\cdot}3$, the introduction of NaCl solution (in Tyrode at the same pH) in the bath does not elicit any contracture; on the contrary, NaCl decreases the effects of well known stimulants such as acetylcholine and histamine. By using the same transformation as in Figure 1, it is possible to demonstrate that the antagonism of NaCl is competitive against both acetylcholine and histamine: actually in presence of NaCl the straight lines describing the action of the agonist show an increased slope with identical intercept (Fig. 2 and 3).

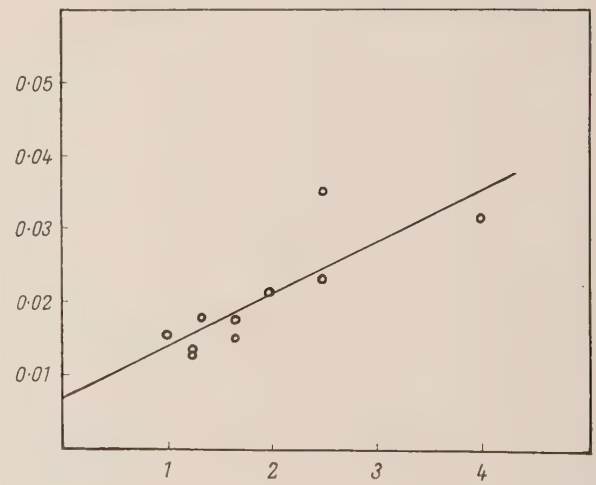


Fig. 1. Action of NaCl at pH = 8,1. – Ordinate: y = 1/effect (height of contraction, in mm); abscissa: x = 1/concentration $\times 10^2$.
Formula: $y = 0{\cdot}00658 + 0{\cdot}007236\,x$. $r = +0{\cdot}83153$.
$0{\cdot}001 < P_{(n=8)} < 0{\cdot}01$

[1] H. Lineweaver and D. Burk, J. Amer. chem. Soc. *56*, 658 (1934).

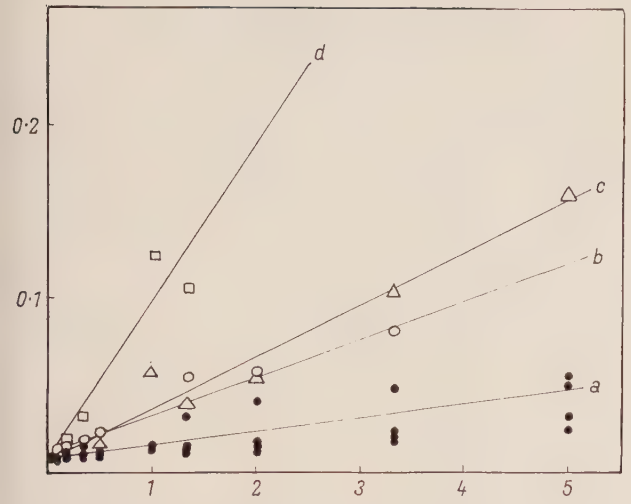


Fig. 2. Competitive antagonism between NaCl and acetylcholine at pH = 5·3-Ordinate: y = 1/effect (in % of the maximal contraction); abscissa: x = 1/concentration of acetylcholine × 10^8.
(a) • acetylcholine alone: $y = 0{\cdot}0104 + 0{\cdot}0061\ x$. $r = +0{\cdot}76351$. $P_{(n=30)} < 0{\cdot}001$.
(b) ○ Id. plus NaCl 2×10^{-3}: $y = 0{\cdot}0150 + 0{\cdot}0215\ x$. $r = +0{\cdot}97743$. $P_{(n=5)} < 0{\cdot}001$.
(c) △ Id. plus NaCl 5×10^{-3}: $y = 0{\cdot}0058 + 0{\cdot}0303\ x$. $r = +0{\cdot}97146$. $0{\cdot}001 < P_{(n=4)} < 0{\cdot}01$.
(d) □ Id. plus NaCl 6×10^{-3}: $y = 0{\cdot}0058 + 0{\cdot}0912\ x$. $r = +0{\cdot}91902$. $0{\cdot}05 < P_{(n=2)} < 0{\cdot}1$.

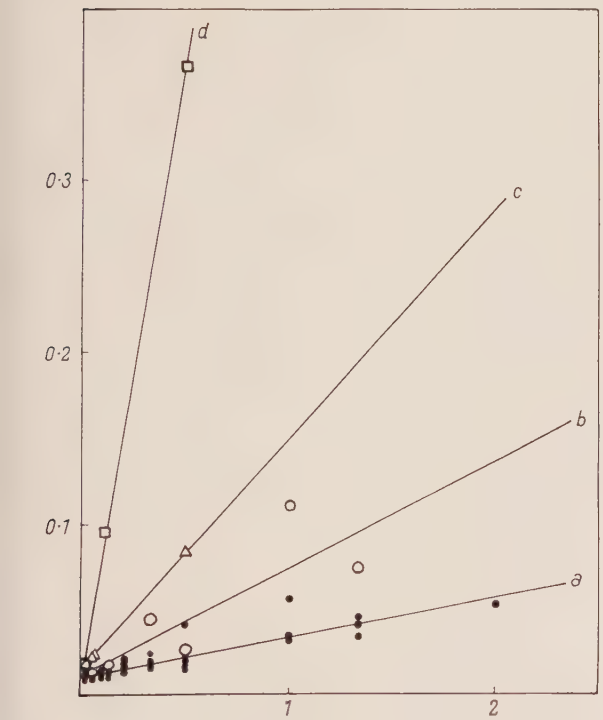


Fig. 3. Competitive antagonism between NaCl and histamine at pH = 5·3. Ordinate: y = 1/effect (in % of the maximal contraction); abscissa: x = 1/concentration of histamine × 10^7.
(a) • histamine alone: $y = 0{\cdot}0109 + 0{\cdot}0236\ x$. $r = +0{\cdot}87383$. $P_{(n=31)} < 0{\cdot}001$.
(b) ○ Id. plus NaCl 2×10^{-3}: $y = 0{\cdot}0109 + 0{\cdot}0634\ x$. $r = +0{\cdot}85590$. $0{\cdot}01 < P_{(n=5)} < 0{\cdot}02$.
(c) △ Id. plus NaCl 3×10^{-3}: $y = 0{\cdot}0146 + 0{\cdot}1370\ x$. $r = +0{\cdot}99993$. $P_{(n=2)} < 0{\cdot}001$.
(d) □ Id. plus NaCl 8×10^{-3}: $y = 0{\cdot}0088 + 0{\cdot}7224\ x$. $r = +0{\cdot}99787$. $0{\cdot}02 < P_{(n=1)} < 0{\cdot}05$.

In order to clear up these data, we suggest an abrupt difference in ileum permeability to Na^+ at different pH values, so that Na^+ penetrates in the cells at alkaline pH, acting as a 'labilizer', whereas at acid pH it does not penetrate and may act as a 'stabilizer'. Investigations with some other aspecific competitioners are being worked out in this Department in order further to elucidate this point.

M. Libonati and G. Segre

Istituto di Farmacologia e Terapia sperimentale, Università di Torino (Italy).

Riassunto

L'NaCl, aggiunto a un bagno – in cui è sospeso un frammento di ileo di cavia – sino a concentrazioni finali comprese fra $2 \cdot 10^{-3}$ e 10^{-2}, agisce come contratturante a pH = 8,0 e come antagonista competitivo dell'acetilcolina e dell'istamina a pH = 5,3.

Hemmung der durch Proteuslipopolysaccharide gesteigerten Leukozytenemigration in vitro durch antiinflammatorische Corticosteroide

Es wurde gefunden und mehrfach bestätigt[1], dass cortisonartige Corticoide die Wanderung von Leucocyten *in vitro* leicht hemmen. In den Lipopolysacchariden aus gramnegativen Keimen haben wir andererseits eine Substanzgruppe gefunden, die die wirksamsten Förderer der Leukozytenemigration *in vitro* umfasst. In welchem Umfange Corticoide die durch LPS geförderte Leukozytenemigration zu hemmen imstande sind, schien deshalb wichtig zu untersuchen.

Das in den vorliegenden Versuchen verwendete Proteuslipopolysaccharid (PLPS) fördert die Auswanderung der Leukozyten über einen grossen Konzentrationsbereich von 10^{-3} bis 10^{-12} mit einem Wirkungsoptimum von 10^{-6} bis 10^{-8}. Höhere Konzentrationen als 10^{-3} hemmen die Auswanderung.

Methode. Blutleukozyten des Huhnes wurden in der früher beschriebenen gewebekulturmässigen Anordnung in einem festen Plasma-Embryonalextrakt-Nährboden zur Auswanderung gebracht. Die PLPS- und Cortison-Lösungen wurden 2 h nach der Explantation gleichzeitig dem Nährboden überschichtet. Explantatgrösse und Auswanderungsareal wurden zu verschiedenen Zeiten bis 18 h planimetrisch erfasst.

Die Auswanderungsförderung durch PLPS ist bei gleichbleibender Nährbodenkonzentration von der explantierten Zellzahl[2], von zelleigenen Faktoren und in geringerem Umfang von Plasmafaktoren abhängig[3]. Da diese Faktoren naturgemäss von Tier zu Tier stark variieren, ist das Ausmass der mit PLPS zu erzielenden Auswanderungsförderung verschieden. Konstant bleibt jedoch das für die verwendete PLPS-Fraktion typische Konzentrations-Wirkungsoptimum.

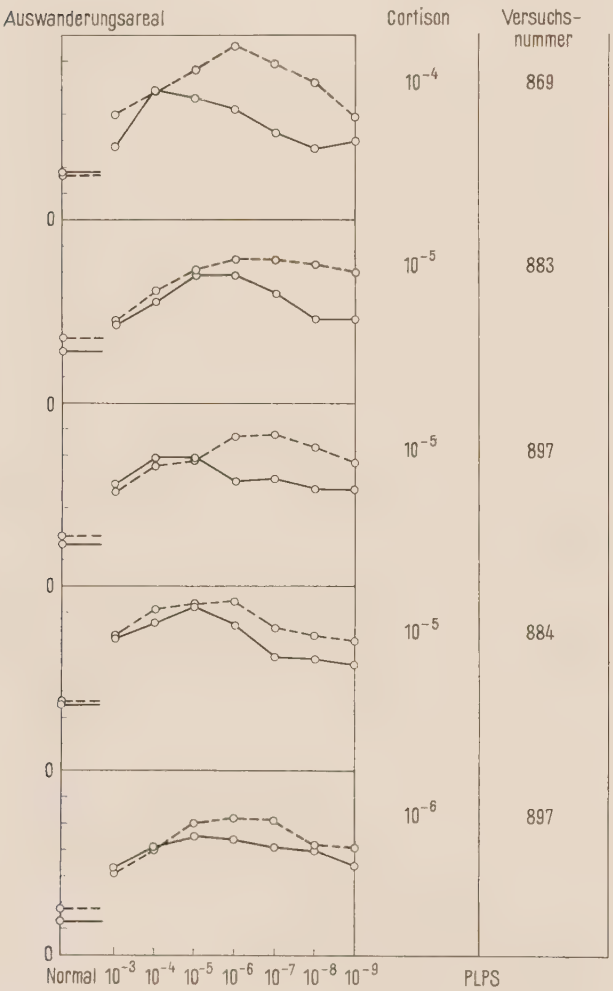
[1] M. Barber und A. Delaunay, J. Path. Bact. *63*, 549 (1951). – M. Holden, B. Seegal und J. Ryby, Amer. J. Path. *27*, 748 (1951). – R. Meier, F. Gross, P. A. Desaulles und B. Schär, Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. *8*, 34 (1952). – G. H. Pfaff und R. Stewart, Proc. Soc. exp. Biol. Med, N. Y. *83*, 591 (1953). – M. M. Ketchel, C. B. Favour und S. H. Surgis, J. exp. Med. *107*, 211 (1958).

[2] R. Meier und B. Schär, Arch. exp. Path. Pharmak. *234*, 102 (1958).

[3] B. Schär, Helv. phys. Acta, im Druck.

Die normale Leukozytenauswanderung wird in unserer Versuchsanordnung durch Cortisonkonzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} nicht regelmässig und in den positiven Fällen nur in geringem Ausmass (bei allen Tieren) gehemmt. Die Hemmbarkeit durch Cortison läuft nicht mit der spontanen Auswanderungsgrösse parallel, da sowohl gut wie schlecht wandernde Leukozyten auf Cortison nicht anzusprechen brauchen.

Regelmässig lässt sich jedoch die Leukozytenemigration durch Cortison hemmen, wenn die Zellen gleichzeitig durch kleine Konzentrationen von PLPS stimuliert sind. Am klarsten kommt dieser Effekt zum Ausdruck, wenn zu einer Konzentrationsreihe PLPS 10^{-3} bis 10^{-10} eine gleichbleibende Konzentration von Cortison beigefügt wird. In einer solchen Versuchsreihe kann nicht nur die absolute Wirkung, sondern die Verschiebung des für die PLPS-Wirkung charakteristischen und konstanten Dosiswirkungsoptimums ermittelt werden. Bei 10^{-4} Cortison wird das PLPS-Wirkungsoptimum um mindestens zwei Zehnerpotenzen von 10^{-6} auf 10^{-4} verschoben, mit 10^{-5} Cortison lässt es sich um mindestens 1 Zehnerpotenz von 10^{-6} auf 10^{-5} verschieben. Entsprechend dieser Verschiebung des «Wirkungsoptimums» der PLPS ist die Auswanderung der Leukozyten in den stark fördernden PLPS-Konzentrationen erheblich herabgesetzt. Bei den niedrigen schwach fördernden PLPS-Konzentrationen ist die Wirkung auf Grund der fehlenden Förderung scheinbar geringer. Die Wirkung der PLPS-Konzentrationen 10^{-3} bis 10^{-5} werden durch Cortison 10^{-5} nicht beeinflusst (Abb.).



Cortisonwirkung auf die durch Proteuslipopolysaccharid (PLPS) stimulierte Leukozytenwanderung *in vitro*

Ordinate: relative Auswanderungsgrösse

$\frac{B-A}{A}$ (B = bewanderte Fläche; A = Explantatgrösse)

Abszisse: PLPS-Konzentration

– PLPS in den angegebenen Konzentrationen

——— Cortison + PLPS in den angegebenen Konzentrationen

Das Ausmass der Cortisonhemmung an PLPS-stimulierten Leukozyten scheint nicht mit dem Ausmass der Cortisonhemmung auf die unbeeinflusst auswandernden Kontrolleukozyten zusammenzuhängen. Auch Zellen, die spontan Cortison-unempfindlich sind, zeigen in stimuliertem Zustand eine gute Hemmung durch Cortison. Hingegen scheint in der vorliegenden Versuchsanordnung eine gewisse Abhängigkeit der Cortison- und PLPS-Konzentration voneinander vorzuliegen.

Für die weitere Charakterisierung des Effektes wurde die Wirkung einer Reihe anderer, besonders antiinflammatorischer Steroide mit derjenigen des Cortisons verglichen.

Die vorläufigen Versuche zeigen, dass andere antiinflammatorisch wirksame Steroide dieser Gruppe ähnlich wie Cortison hemmen, wobei die Wirksamkeit von Dexamethason am stärksten ausgeprägt ist, hingegen für Dihydrocortison keine Wirkung nachweisbar ist.

Da die Steigerung der Leukozytenemigration durch PLPS *in vitro* einer analogen Reaktion bei der Entzündung *in vivo* entsprechen kann, ist eine naheliegende Frage, ob dieser Effekt ein Ausdruck des Wirkungsmechanismus der antiinflammatorischen Steroide grundsätzlichen Charakters ist. Dies ist möglich. Eine gewisse Schwierigkeit eines überzeugenden Beweises besteht aber darin, dass die Leukozytenhemmung *in vitro* nicht mit der Wirkungsstärke *in vivo* voll parallel geht. Dies kann durch die übrigen Verhältnisse des tierischen Organismus bedingt sein (Zeitwirkungsverhältnisse, Umbau, Metaboliten usw.). Ferner zeigen auch einzelne Steroide *in vitro* eine geringe Leukozyten-hemmende Wirkung, ohne eine analoge antiinflammatorische Wirkung *in vivo* zu haben. Auch dies Verhalten kann vorläufig nur auf die verschiedenen Verhältnisse *in vitro* und *in vivo* bezogen werden, trotzdem wohl auch andere Erklärungsmöglichkeiten bestehen. Die Hemmung der PLPS-gesteigerten Leukozytenemigration durch Corticoide *in vitro* kann somit als «typischer» Ausdruck der Wirkung antiinflammatorischer Steroide angesehen werden, ohne dass aber die antiinflammatorische Wirkung auf die Leukozyten oder auf andere entzündliche Phänomene *in vivo* allein in einer Wirkung dieses Charakters bestehen müsste.

B. Schär und R. Meier

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, 25. April 1960.

Summary

The migration of leucocytes from the buffy coat of chicken blood is slightly but irregulatly inhibited by cortison. If migration of leucocytes is increased by proteus lipopolysaccharide, cortison in concentrations of 10^{-4}–10^{-6}, and other anti-inflammatory steroids, produce a pronounced and constant inhibition of leucocytic migration.

Séparation par chromatographie sur papier des 21 sulfates de corticostéroïdes

Différentes études ont été faites sur la séparation chromatographique des sulfates et des glucosid uronates de stéroïdes[1-5], mais il n'existe encore aucune étude systématique sur la séparation des 21-sulfates de corticostéroïdes.

La synthèse des ester-sulfates de corticostéroïdes a été effectuée par action du complexe SO_3-Pyridine en milieu pyridinique[6]. Nous avons isolé les sulfates de désoxycorticostérone (DOC), corticostérone (B), 11-dehydrocorticostérone (A), cortisol (F), cortisone (E) et 17α-hydroxy-11 désoxycorticostérone (S), sous forme de sels de pyridinium[7] et le sulfate de désoxycorticostérone sous forme de sel sodique[8].

Les ester-sulfates ont été cristallisés dans le méthanol-éther.

Nous avons ensuite procédé à l'étude de la séparation chromatographique sur papier et nous avons mis au point les deux systèmes suivants:

(I) Ac. But. 60-Tol. 30-But. 10/$HONH_4$ 4*N*. 50-Met. 50[9]; (II) Ac. But. 50-Tol. 40 But. 10/Ac. Acet. 10% 50-Met. 50.

Parallèlement, nous avons réalisé une étude comparative avec les systèmes:

(III) Al. Isoamylique – Hexane/$HONH_4$ conc.[10]; (IV) Ac. But. – But/Ac. Form. – Eau[1].

Révélation des sulfates de corticostéroïdes. Le stéroïde libéré et l'ion sulfate libéré après hydrolyse ont été ensuite révélés par des réactions caractéristiques.

Nous avons constaté que les 21 sulfates de corticostéroïdes ne réduisent pas le bleu de tétrazolium; après hydrolyse cette réaction devient positive et l'ion sulfate libéré donne la réaction au rhodizonate de Sodium[11,3].

Pour hydrolyser les sulfates de corticostéroïdes directement sur le papier, nous avons modifié d'une part la technique de Cohen et Oneson[12] en opérant de la façon suivante: le chromatogramme est plongé dans un mélange d'acide trichloracétique à 5% P/v dans le dioxane et chauffé pendant 15 min à 90°C; d'autre part, nous avons appliqué la technique d'hydrolyse au dioxane-acide chlorhydrique[3].

Nous avons également utilisé pour révéler les taches des estersulfates une méthode au bleu de méthylène mise au point dans le laboratoire par Crépy[13].

Nous avons appliqué aux stéroïdes libres et aux sulfates les méthodes de révélation du groupe Δ_4 3C = 0: absorption à 254 mμ et fluorescence en lumière de Wood après chauffage en milieu sodique, ainsi que la réaction de fluorescence par action de l'acide phosphorique à 15%, également en lumière de Wood, nous avons constaté que toutes ces réactions étaient positives avec les sulfates de corticostéroïdes ainsi qu'avec les stéroïdes libres correspondants.

Résultats. Le Tableau suivant montre les R_t de ces six sulfates par rapport au sulfate de désoxycorticostérone dans les différents systèmes, ainsi que celui du sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA) et la vitesse horaire de migration à 24°C ± 1°.

Conclusions

1° Les systèmes décrits permettent de réaliser la séparation de 21-sulfates de corticostéroïdes par chromatographie sur papier.

2° L'hydrolyse de ces corticostéroïdes conjugués est obtenue avec les procédés étudiés.

3° Les 21-sulfates de corticostéroïdes ne donnent pas la réaction au bleu de tétrazolium, cette réaction devient positive après hydrolyse directe sur le chromatogramme.

4° Les méthodes générales de révélation sur papier des sulfates de stéroïdes sont applicables aux 21-sulfates de corticostéroïdes.

5° Nous avons constaté que la migration des ester-sulfates de désoxycorticostérone et de pyridinium et de l'ester-sulfate de cortisone et de pyridinium est respectivement la même que celle des ester-sulfates de désoxycorticostérone et de sodium et de l'ester-sulfate de cortisone et de sodium.

[1] M. L. Lewbart et J. J. Schneider, Natur *176*, 1175 (1955).
[2] I. E. Busch, Biochem. J. *67*, 23 (1957).
[3] J. J. Schneider et M. J. Lewbart, J. biol. Chem. *222*, 787 (1956).
[4] G. Cavina et L. Tentori, Clin. chim. Acta *3*, 160 (1958).
[5] J. J. Schneider et M. J. Lewbart, Rec. Proc. Horm. Res. *15*, 201 (1959).
[6] A. E. Sobel et P. E. Spoerri, J. Amer. chem. Soc. *63*, 1259 (1941).
[7] Les caractéristiques chimiques et physiques de ces sulfates feront l'objet d'une note ultérieure.
[8] Nous remercions vivement le Dr L. H. Sarett (Merck & Co. Inc., Rahway, New Jersey) d'avoir eu l'amabilité de nous procurer du sulfate de cortisone et de sodium.
[9] Ac. But.: Acétate de Butyle; Tol.: Toluène; But.: Butanol; Ac. Acet.: Acide Acétique; Met.: Méthanol; Ac. For.: Acide Formique.
[10] Système de référence [4], Modification O. Crepy, Communication personnelle.
[11] D. P. Burma, Analyt. chim. Acta *9*, 513 (1953).
[12] S. L. Cohen et I. B. Oneson, J. biol. Chem. *204*, 245 (1953).
[13] O. Crepy et O. Judas, Rev. franç. Et. clin. biol., mars 1960.

Conjugués	Systèmes chromatographiques				
	I		II	III	IV
	$R_{t_{SO_4DOC}}$	$R_{t_{SO_3B}}$	$R_{t_{SO_4DOC}}$	$R_{t_{SO_4DOC}}$	$R_{t_{SO_4DOC}}$
Sulfate de DOC et de Py	1	2,50	1	1	1
Sulfate de DOC et de Na	1	2,50	1	1	1
	1,20 cm/h		0,51 cm/h	1,3 cm/h	0,69 cm/h
Sulfate de A et de Py	0,36	0,92	0,54	0,61	0,33
Sulfate de B et de Py	0,40	1	0,58	0,70	0,37
Sulfate de S et de Py	0,30	0,78	0,50	0,78	0,43
Sulfate de E et de Py	0,16	0,42	0,25	0,46	0,18
Sulfate de E et de Na	0,16	0,42	0,25	0,46	0,18
Sulfate de F et de Py	0,25	0,55	0,35	0,58	0,25
Sulfate de DHEA et de Na	1,15	2,87	1,13	1	1

6° Il est à signaler que l'ester-sulfate de cortisone est plus polaire que l'ester-sulfate de cortisol dans tous les systèmes essayés. Il en est de même pour le sulfate de 11 déhydrocorticostérone qui est plus polaire que le sulfate de corticostérone, donc la polarité de ces sulfates est inversée par rapport à celle du stéroïde libre.

J. R. Pasqualini, R. Zelnik et M. F. Jayle

Laboratoire de chimie biologique, Faculté de Médecine, Paris (France), le 1er avril 1960.

Summary

The 21-sulfates of the six following corticosteroids: desoxycorticosterone (DOC), corticosterone (B), 11-dehydrocorticosterone (A), cortisol (F), cortisone (E), and 17α hydroxy-11-desoxycorticosterone (S), were prepared. Their separation by four different paper chromatographic systems was investigated. A method for detection of the spots is described.

On the Thermogenic System of Hibernants[1]

It is generally assumed that heat production in the hibernant during arousal comes from respiration and from muscular activity[2]. It has been shown that the ATP stores of the hibernator become depleted during arousal[3]. This is interpreted as a kind of ATPase action of the tissues either of the myosin type or of another.

Studies in this laboratory have been directed in part to assess the role, if any, of ATPase and acylphosphatase in thermogenesis in the awakening hibernator. The purpose of this report is to publish results leading to a theory of thermogenesis in the hibernant.

The tissue preparations from mature hamsters were solubilized in 9·0 volumes of 0·5% triton X-100-0·5 *mM* EDTA and the supernate used after centrifugation 30 min at 25000 × *g*. Acylphosphatase was measured by the method of Grisolia *et al.*[4] and ATPase by the method of Lowry *et al.*[5]. The tissue preparations of normal and hibernating hamsters studied were, from the brain: brain stem, cerebellum, cerebral cortex, hippocampal region, and thalamic-hypothalamic region; and from the carcass: heart, liver, and gracilis muscle. Each set of data represents the values obtained from 12 to 14 animals.

For the purposes of this discussion it is sufficient to summarize the data in Tables I and II. More detailed reports will appear. It is seen that acylphosphatase is much less sensitive to lowering temperature than is the ATPase. In spite of an apparantly greater relative increase of ATPase in the hibernator than of acylphosphatase, the latter enzyme is much more active at the hibernating temperature used in these studies (0–2°C).

On the basis of data published on the respiration and heat production of hibernators[7], and on an assumed − 12 Kcal mole^{-1} as the ΔH of hydrolysis of acylphosphates and − 8 Kcal mole^{-1} as ΔH for ATP[8], Table III was constructed.

It is seen from this that ATPase is not sufficient even to maintain the homeothermic state of the hibernator at an environmental temperature near 0°C. Much less is it capable of initiating the temperature rise which occurs early in arousal. Acylphosphatase, on the other hand, is more than adequate for this service. The fact that it may be much more active than necessary near 0°C is not an impediment to this concept of its function. It is not difficult to conceive cases where the enzyme would operate *in vivo* at lower than maximum activity, as is the normal case with most enzymes. The enzyme measured in these studies represents the total amount of active enzyme. It seems to be distributed between the cellular particles and the nonsedimentable portion in nonsolubilized preparations.

The most probable substrate for acylphosphatase *in vivo* is 1,3-diphosphoglyceric acid which may arise from the cleavage and oxidation of fructose-1,6-diphosphate, from ATP and 3-phosphoglycerate, and from phosphocreatine and 3-phosphoglycerate[9], all of which pathways seem to operate in the hibernating hamster.

The relatively higher activity of acylphosphatase in the brain, according to the concept enunciated here, would be consistent with the fact that the head parts of the hibernator warm sooner and faster than the hind parts[2]. It is suggested that acylphosphatase plays its role in two stages: first it releases energy stored as phosphocreatine and ATP which process would be sufficient to warm the animal to the point where glycolysis and respiration become important in thermogenesis, and then it would act as an energy discharging system after glycolysis resumed[10].

L. C. Mokrasch

Neurochemistry Laboratory, University of Kansas Medical Center, Kansas City, April 5, 1960.

Table I. Acylphosphatase

Tissue	0°C Normal Activity[a]	Activity ratio 38°C/0°C		Activity ratio Hibernator /Normal	
		Hibernator	Normal	38°C	0°C
5 Brain Zones	4·16	5·4	5·9	1·03	1·13
3 Carcass Zones	2·51	9·2	9·2	1·04	1·02

[a] Average, μM min^{-1} g^{-1} tissue. Temperatures are those at which the assay was performed

Table II. Adenosinetriphosphatase

Tissue	0°C Normal Activity[a]	Activity ratio 38°C/0°C		Activity ratio Hibernator /Normal	
		Normal	Hibernator	38°C	0°C
5 Brain Zones	0·048	110	90	0·94	1·17
3 Carcass Zones	0·050	150	89	1·30	1·76

[a] Average, μM min^{-1} g^{-1} tissue. Temperatures are those at which the assay was performed.

Table III. Summary of Normal and Potential Thermogenesis in the Hamster

Hibernating (5°C): 0·09 to 0·14 Kcal h^{-1} kg^{-1}
Calculated for 1st h of arousal: 5 to 7 Kcal h^{-1} kg^{-1}
ATPase (0°C): 0·02 to 0·04 Kcal h^{-1} kg^{-1}
Acylphosphatase (0°C): 3 to 4 Kcal h^{-1} kg^{-1}
Acylphosphatase (10°C): 5 to 6·5 Kcal h^{-1} kg^{-1}

[1] This investigation was supported by P. H. S. grant B-2133 from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness.

[2] C. P. Lyman and P. O. Chatfield, J. exp. Zool. *114*, 491 (1950).

[3] M. L. Zimny and R. Gregory, Amer. J. Physiol. *195*, 233 (1958).

[4] S. Grisolia, J. Caravaca and B. K. Joyce, Biochem. biophys. Acta *29*, 432 (1958).

[5] O. H. Lowry, N. R. Roberts, M.-L. Wu, W. S. Hixon, and E. J. Crawford, J. biol. Chem. *207*, 19 (1954).

[6] C. Kayser, C. R. Soc. Biol., Paris *153*, 167 (1959).

[7] C. P. Lyman, J. exp. Zool. *169*, 55 (1948).

[8] E. A. Robbins and P. D. Boyer, J. biol. Chem. *224*, 121 (1957).

[9] O. Cori, A. Traverso-Cori, M. Lagarrique, and F. Marcus, Biochem. J. *70*, 633 (1958).

[10] I. Harary, Biochem. biophys. Acta *29*, 647 (1958).

Über die Wirkung von Phenanthrenchinon (9,10) und einer wasserlöslichen Transportform auf Glykolyse und Atmung des Ascites-Tumor

Im Rahmen von Versuchen über die Einwirkung von Chinonen auf Glykolyse und Atmung von Ehrlichs Mäuse-Ascites-Tumor[1,2] wurden unter anderem Phenanthrenchinon (9, 10) und das in Wasser leicht lösliche Hydrobromid des Phenanthrenhydrochinon (9,10)-bisglycylesters untersucht. Beide Substanzen erwiesen sich als sehr wirksame Glykolysehemmstoffe; bei Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-5}$ *M*/l Chinon oder Ester im Aussenmedium fällt die Glykolyse innerhalb kurzer Zeit auf geringe Werte ab.

In Abbildung 1 ist das Verhalten von Atmung und Glykolyse bei einem Versuch mit Phenanthrenchinon dargestellt. Während des Absinkens der Glykolyse wird ein Atmungsanstieg auf das Dreifache des Normalwertes beobachtet (Diagramm a); der gleiche Anstieg wurde auch in Phosphatpuffer mit KOH im Einsatz gemessen. Nach 10 min klingt der Atmungsanstieg bereits wieder ab und die Atmung sinkt unter den Wert der Kontrolle. In *nicht glykolysierenden* Zellen (Diagramm b) fällt dagegen die endogene Atmung unter der Einwirkung des Chinons ohne vorherigen Anstieg langsam und stetig ab.

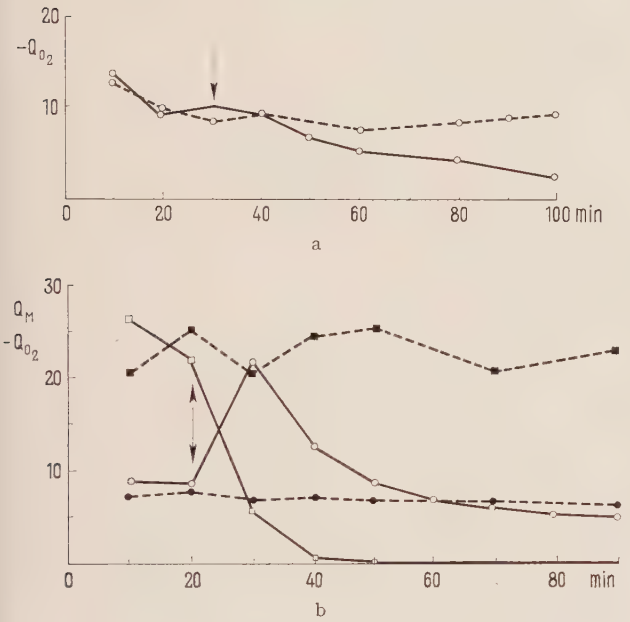


Abb. 1. Einwirkung von Phenanthrenchinon ($1 \cdot 10^{-5}$ *M*/l) auf Atmung und Glykolyse

a) Aerobe Glykolyse und Glukoseatmung
□—□— Glykolyse mit Chinon
■--■-- Glykolyse Kontrolle
○—○— Atmung mit Chinon
●--●-- Atmung Kontrolle
b) Endogene Atmung
mit Chinon
– – – – Kontrolle

60 mg Zellen/Ansatz (Gefässpaarmethode) in Ringer-Bikarbonat; 4 min mit 5% CO_2/Luft durchströmt. Chinon wird aus der Birne eingekippt (Pfeil). Temperatur 37°

Zur genaueren Untersuchung dieser Vorgänge wurden die Nukleotide Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und Diphosphopyridinnukleotid (DPN), das anorganische Phosphat sowie die Glykolysezwischenprodukte Glukose-6-Phosphat (G-6-P), Hexosediphosphat (HDP) und die Triosephosphate unter verschiedenen Bedingungen und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Chinon bestimmt. Die Bestimmung der Nukleotide und der Zukkerphosphate erfolgte nach der Methode der optischen Tests von Warburg, wobei neutralisierte Perchlorsäureextrakte aus den Ansätzen untersucht wurden.

Die Ergebnisse der Nukleotidbestimmungen zeigt Abbildung 2. Der ATP-Gehalt *glykolysierender* Zellen fällt nach $2^1/_2$ min Phenanthrenchinoneinwirkung um etwa 40% ab, während ADP um 60% ansteigt (a). *Ohne Glucose* erfolgt praktisch kein ATP-Abfall und kein ADP-Anstieg (b). Nach 10 min ist im glykolysierenden System ATP nahezu verschwunden[3], der ADP-Spiegel etwa gleich dem Kontrollwert; AMP ist um 70% angestiegen (c). Ohne Glukose sind die Unterschiede gegenüber den Kontrollen

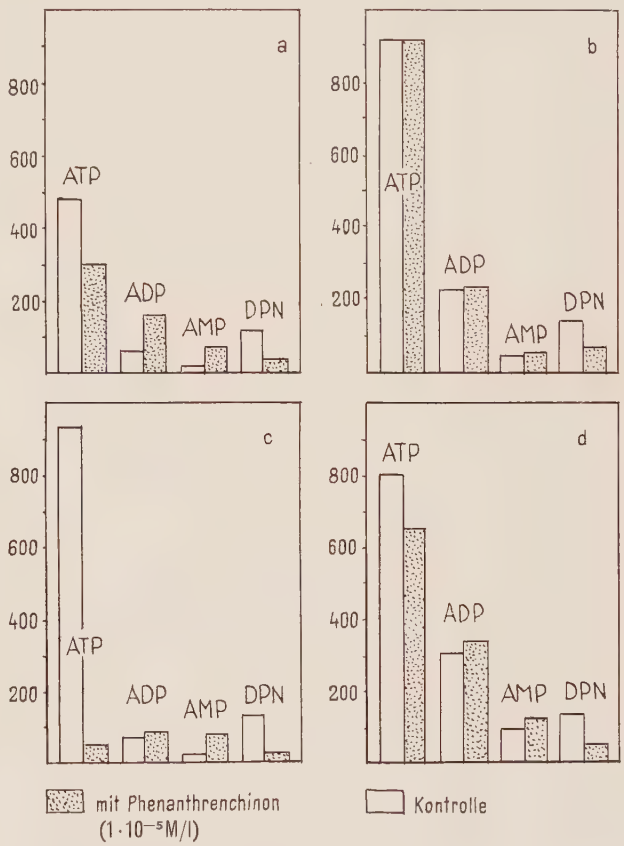


Abb. 2. Nukleotid-Gehalte in γ/1000 mg Frischgewicht

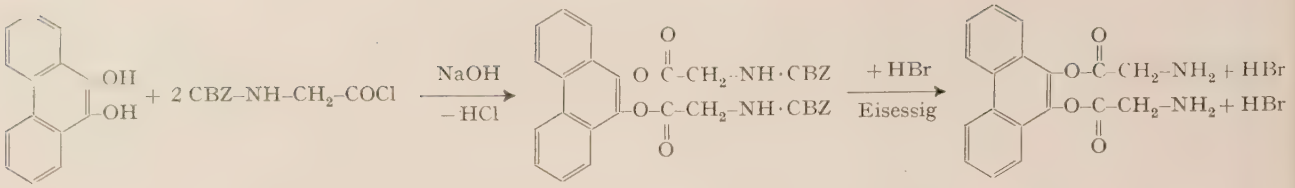
a) mit Glukose 0,2%; Inkubation $2^1/_2$ min
b) ohne Glukose; Inkubation $2^1/_2$ min
c) mit Glukose 0,2%; Inkubation 10 min
d) ohne Glukose; Inkubation 10 min

Ca. 1500 mg Zellen/Ansatz in Ringer-Bikarbonat 4 min mit 5% CO_2/Luft durchströmt, in Erlenmeyer-Kolben geschüttelt. Gesamtvolumen 75 ml; Temperatur 37°. Zellen nach Inkubation 3 min bei 20°C und niedriger Tourenzahl abzentrifugiert, mit 10% $HClO_4$ extrahiert

[1] H. Tiedemann, H. J. Risse und J. Born, Z. Naturf. *13b*, 657 (1958).

[2] H. Tiedemann und J. Born, Biochim. biophys. Acta *27*, 656 (1958). – H. Tiedemann und J. Born, Z. Naturf. *13b*, 268 (1958).

[3] Bei Versuch I, II und IV ist die Summe ATP + ADP + AMP in den Ansätzen mit Chinon gleich der Summe in den Kontrollen. Wo die Differenz bei Versuch c herrührt, bleibt noch ungeklärt.



ohne Chinon auch nach 10 min nicht gross (d)[4]. DPN fällt schon nach $2^1/_2$ min (auch ohne Glukose) stark ab.

In glykolysierenden Ansätzen kommt es zu einer starken Anhäufung von HDP (um das Zehnfache) und Triosephosphaten (um das Vier- bis Fünffache), während G-6-P nur verdoppelt wird. Gleichzeitig verschwindet das anorganische Phosphat zu 80%.

Das Absinken des DPN bei allen Versuchen lässt vermuten, dass hier der Angriff des Chinons erfolgt. In glykolysierenden Zellen wird die Reaktionskette durch den DPN-Mangel auf der Stufe der Glyzerinaldehydphosphatdehydrierung gebremst. Da jedoch die phosphorylierenden Reaktionen der Glykolyse (Hexokinase- und Phosphofruktokinase-Reaktion) nicht oder nur wenig gehemmt sind, wird ein grosser Teil des anorganischen Phosphates und das endständige Phosphat von ATP in den Hexose- und Triosephosphaten festgelegt. Ausserdem wird auch vom ADP über eine Myokinasereaktion Phosphat an die Glykolyse abgegeben. Hierfür spricht, dass die ADP-Erhöhung nach längerer Inkubation wieder zurückgeht (Abb. 2, c).

Mit diesem Mechanismus steht in Übereinstimmung, dass in nicht glykolysierenden Zellen nur ein geringer ATP-Abfall beobachtet wird und die ADP-Konzentration nicht ansteigt (Abb. 2, b). In glykolysierenden Zellen kann die oben beschriebene Atmungssteigerung durch die Erhöhung der ADP-Konzentration erklärt werden, da ADP nach Chance[5] die Atmungskontrolle ausübt.

In intakten Zellen wird Phenanthrenchinon offenbar über einen anderen Mechanismus wirksam als Menadion (2-Methyl-1, 4-Naphthochinon) in Homogenaten bei Überschuss von DPN. Bei Versuchen mit Homogenaten wurden die Enzyme Hexokinase und Phosphohexokinase am stärksten gehemmt[1,6]. Von Holzer *et al.*[7] konnte die Hemmwirkung von Äthyleniminochinonen ebenfalls mit einer DPN-Abnahme in Zusammenhang gebracht werden.

Bei Gefässpaarversuchen mit *Ascitesserum* als Inkubationsmedium zeigte sich Phenanthrenchinon und auch der Bisglycylester im Gegensatz zum Menadion ebenso wirksam wie in Ringer-Bikarbonat-Lösung. Anscheinend tritt die allgemeine Reaktion mit Proteinen (Oxydation von SH-Gruppen, Anlagerung) gegenüber der spezifischen Reaktion auf den Stoffwechsel zurück. Da die Chinone in den Zellen akkumuliert werden, hängt die Hemmwirkung aber von der Zellkonzentration im Versuchsansatz ab.

Da unter physiologischen Verhältnissen, wie Warburg[8] erstmalig fand, nur Tumorzellen (und Netzhaut) stark glykolysieren, könnte auf Grund des dargelegten Mechanismus eventuell eine gewisse Selektivität für Tumorzellen vorhanden sein. Doch hängt diese natürlich noch von anderen Faktoren wie der Verteilung im Organismus und der Aufnahmegeschwindigkeit in die verschiedenen Zellarten ab. Eine chemotherapeutische Wirkung von Phenanthrenchinon auf Mäusetumoren wurde von Powell[9] sowie von Leiter *et al.*[10] beobachtet. Lehmann[11] fand bei Tubifex-Eiern eine sehr starke antimitotische Wirksamkeit.

Der bisher noch nicht dargestellte Bisglycylester wurde durch Umsetzung von Phenanthrenhydrochinon(9, 10) mit Carbobenzoxy(CBZ)-glycylchlorid und Abspaltung des CBZ-Restes mit 1 *n* HBr in Eisessig dargestellt.

Die mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgesellschaft ausgeführten Untersuchungen werden fortgesetzt.

H. Tiedemann und H. J. Risse

Heiligenberg-Institut (Abt. O. Mangold) und Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i. Br., 12. Januar 1960.

Summary

Phenanthrenchinon (9, 10) and hydrochinon-bis-glycylester prepared as water-soluble 'transportform', are strong inhibitors of glycolysis. Glycolysing cells are depleted from ATP in a few minutes.

[4] Inwieweit durch Phenanthrenchinon die oxydative Phosphorylierung entkoppelt wird, bedarf weiterer Untersuchungen.

[5] B. Chance, Int. Symp. Enz. Chemistry, Tokyo (1957), p. 9.

[6] O. Meyerhof und L. O. Randall, Arch. Biochem. *17*, 171 (1948).

[7] H. Holzer, P. Glogner und G. Sedlmayer, Biochem. Z. *330*, 59 (1958).

[8] O. Warburg, *Über den Stoffwechsel der Tumoren* (Berlin 1926).

[9] A. K. Powell, Brit. J. Cancer *5*, 264 (1951).

[10] J. Leiter, J. L. Hartwell, J. S. Kahler, I. Kline und M. J. Shear, J. nat. Cancer Inst. *14*, 365 (1953).

[11] F. E. Lehmann, Exper. *3*, 223 (1947). – Schweiz. Z. Path. Bakt. *14*, 487 (1951).

Effect of the Glucagon on the Plasma Insulin-Activity after Hypophysectomy

It is unquestionable that the hypophysis plays an important part as regards the insulinic effect of plasma. Randle[1] has pointed out the existence of very high values for the insulinic effect of the plasma in acromegaly, and Candela *et al.*[2] and other authors have confirmed this. On the other hand, Randle and Young[3] have demonstrated that the plasma of hypophysectomized rats does not show any insulinic effects; and Randle[4] has observed that the insulinic effect of the plasma is very low in cases of hypopituitarism (human).

The experiments reported here were aimed at ascertaining whether the disappearance of the insulinic effect of the plasma has a constant course, in alloxan and pancreatectomized diabetes, and whether the treatment with glucagon has some influence on the disappearance of the plasma insulin effect following hypophysectomy.

Methods. The plasma insulin effect is determined in the following cases:

1. Normal rats (both sexes). 2. Alloxan diabetes. 3. Pancreoprive diabetes. 4. Hypophysectomized rats. 5. Hypophysectomized rats treated with glucagon.

[1] P. J. Randle, Lancet *1954*, 441.

[2] J. L. R-Candela, Y. Valladares, and R. R-Candela, Rev. esp. Enf. del Aparato Dig. y de la Nutr. *15*, 48 (1956).

[3] P. J. Randle and F. G. Young, J. Endocrin. *13*, 335 (1956).

[4] P. J. Randle, Lancet *1954*, 809.

Table 1. Plasma Insulin Effect in Normal Rats

	Mean	σ	t	P	No. exp.
with cystein	0·435	0·057	8·950	$< 0{\cdot}01$	6
without cystein	0·625	0·032			6

The plasma treated with cystein, to destroy insulin, induces to a lower consumption of glucose by the diaphragm. The difference between the consumption induced by the native plasma and treated plasma, is the insulinic effect, expressed here in mg of glucose consumed per 100 mg of diaphragm during 1 h incubation in Warburg apparatus. Statistically, the result is significant.

Table 2. Plasma Insulin Effect in Alloxan Diabetes

	Mean	σ	t	P	No. exp.
with cystein	0·470	0·050	1·453	$0{\cdot}1 < P < 0{\cdot}2$	10
without cystein	0·505	0·038			8

Once the Langerhans islets are destroyed (B cells *only*), the insulinic effect of the plasma disappears. The small difference between the effect of both plasmas is not significant from a statistical standpoint.

Table 3. Plasma Insulin Effect in Pancreoprive Diabetes

	Mean	σ	t	P	No. exp.
with cystein	0·571	0·047	0·967	$0{\cdot}3 < P < 0{\cdot}4$	9
without cystein	0·600	0·068			9

As is logical, there is no insulinic effect of the plasma. The slight difference in the effect between both plasma is not statistically significant.

Table 4. Plasma Insulin Effect After Hypophysectomy

	Mean	σ	t	P	No. exp.
with cystein	0·468	0·033	0·857	$0{\cdot}4 < P < 0{\cdot}5$	7
without cystein	0·486	0·037			7

The consumption of glucose induced by the plasma, either treated or untreated with cystein, is the same in both cases. The plasma of the hypophysectomized rat has no insulinic effect.

Table 5. Plasma Insulin Effect in Hypophysectomized Rat Treated with Glucagon

	Mean	σ	t	P	No. exp.
with cystein	0·472	0·127	2·128	$P = < 0{\cdot}05$	9
without cystein	0·638	0·141			9

The insulinic effect which disappeared on hypophysectomy, reappears again.

Full-grown rats of both sexes have been utilized (140 to 180 g), coming from our own stock and fed with a 'standard' diet. The alloxan diabetes, pancreatectomy, and hypophysectomy were carried out by the methods described in previous works[5]. The evaluation of insulin in the plasma was carried out by the technique already described[1], modified in that only 0·1 cm³ of plasma were utilized instead of 1 cm³ as described in the first of our works. The insulinic effect of the plasma is expressed by the difference in glucose uptake induced by the addition of normal plasma and treated with cystein. In hypophysectomized rats treated with glucagon, 0·5 mg of this hormone dissolved in Bayol-F were used. Two subcutaneous injections were made, the second one three days after the first. The animals were sacrificed three days after the second injection. The absence of hypophysis was always ascertained after the sacrifice of the animal.

Discussion. The disappearance of the insulinic effect of the plasma after the removing of the pancreas or the alloxan diabetes, does not logically require any comment. However, the reason why in acromegaly (Randle, Candela, Valladares, and Candela) the insulinic activity in the plasma is very high and disappears with hypophysectomy, has not been explained. Randle and Young have also observed that if hypophysectomized animals are submitted to an early treatment with hormones for growth, the insulinic effect does not disappear. The fact that by treatment with glucagon, the insulinic effect of the plasma is maintained within the normal range has undoubted interest, among other reasons because it would suggest that its secretion is governed (stimulated) by the pituitary gland as was presumed by Bornstein[6].

R. R-Candela

Instituto de Metabolismo y Nutrición, Madrid (Spain), December 24, 1959.

Résumé

La disparition de l'effet insulinique du plasma que l'on observe après l'hypophysectomie n'a pas lieu quand les animaux (rats) ont été préalablement soumis à un traitement de glucagon (0,5 mg suspendu en Bayol F).

[5] I thank Dr. P. M. Goni for the carrying out of the pancreatectomies and hypophysectomies.

[6] J. Bornstein, Personal communication to J. L. R-Candela.

Beeinflussung der Bromsulphalein-Clearance durch Sulfonamide beim Kaninchen

Bromsulphalein (BSP) gehört zusammen mit Bilirubin, Fluoreszein u. a. zu einer Gruppe von Substanzen, welche in bezug auf ihr Verhalten im Blut und in der Leber mehrere gemeinsame Züge aufweisen. Eine dieser Eigenschaften ist die Neigung, mit den Bluteiweissen Komplexe zu bilden, und es darf vermutet werden, dass diese Bindung nicht nur für den Transport dieser Farbstoffe, sondern auch für den Aufnahmemechanismus in der Leber irgendwie von Bedeutung ist. Auch Sulfonamide finden sich im Blut zum Teil an Eiweiss gebunden, wobei sie Bilirubin von der Bindungsstelle zu verdrängen scheinen[1,2]. In diesem Zusammenhang interessiert die Frage, ob Sulfonamide die BSP-Clearance beeinflussen würden.

Methodik: Injektion von 5 mg/kg BSP intravenös, anschliessend Infusion von 0,5 bzw. 0,75 mg/kg/min BSP intravenös an 2 bis 3 kg schwere Kaninchen während etwa

[1] G. B. Odell, J. clin. Invest. *38*, 823 (1959).
[2] G. B. Odell, J. Pediat. *55*, 268 (1959).

BSP-Konzentrationen im Plasma während kontinuierlicher Infusion an Kaninchen vor bzw. nach Verabreichung von Sulfonamiden

Präparat	Dosis mg/kg	BSP-Infusion mg/kg/min	BSP in Plasma (mg%)		
			vor Sulfonamid	nach Sulfonamid	% Abnahme
Sulfisoxazol i. v.	288	0,5	3,2	1,9	41
	286	0,5	3,5	1,5	57
	267	0,75	8,0	2,9	64
	293	0,75	4,8	3,0	38
	83	0,75	4,2	2,0	52
	34	0,75	5,7	1,9	67
	8	0,75	4,4	3,8	14
	8	0,75	5,9	4,4	25
	2	0,75	5,0	4,6	8
in den Magen	824	0,75	5,3	2,3	57
	455	0,75	9,2	5,1	45
	229	0,75	5,3	2,1	60
	23	0,75	5,4	4,2	22
Sulfasomidin i. v.	145	0,75	14,1	5,3	62
	18	0,75	4,4	2,4	45
Sulfadimethoxin i. v.	81	0,75	4,9	2,1	57
	39	0,75	3,9	2,2	44
	4	0,75	5,4	4,2	22
	3	0,75	5,2	4,1	21
in den Magen	224	0,75	7,7	2,8	64
	22	0,75	4,0	2,5	38
	20	0,75	5,0	3,3	34
Sulfaphenazol in den Magen	256	0,75	7,4	2,7	64
Kombination von N^1-(4-Isopropoxy-benzoyl)-sulfanilamid + Sulfamerazin	334	0,75	6,2	3,1	50
	175	0,75	9,3	4,7	49
Sulfamethoxypyridazin in den Magen	42	0,75	6,0	2,0	67

2 h. Nach Einstellung einer relativ konstanten Blutkonzentration Verabreichung des zu prüfenden Sulfonamids (Sulfisoxazol[3], Sulfasomidin, Sulfadimethoxin[4], Sulfaphenazol, eine Kombination von N^1-(4-Isopropoxy-benzoyl)-sulfanilamid + Sulfamerazin und Sulfamethoxypyridazin) entweder ebenfalls intravenös am «Entnahme-Ohr» oder in den Magen durch einen Tage bis Wochen vorher eingenähten Polyäthylenkatheter.

In Einzelfällen operative Vorbereitung in Pentothal-Äthernarkose mit Ligatur des Cysticus, Kanülierung des Choledochus und Einnähen eines Magenkatheters; 24 bis 48 h später BSP-Infusion am wachen Tier mit laufender Untersuchung der Galle bei erhaltenem enterohepatischem Kreislauf. BSP-Bestimmung kolorimetrisch nach Seligson *et al.*[5].

Ergebnisse. Während der BSP-Infusionen von 0,75 mg/kg/min stellte sich bei den nicht operierten Tieren ein Gleichgewicht bei 4,89 ± 0,63 mg/100 ml Plasma ein, entsprechend einer Clearance von 15,3 ml/kg/min. Dieser Normalwert stimmt mit dem von Lewis angegebenen (16,2 ml/kg/min) gut überein[6]. Bei den Fällen mit vorgängiger Operation waren die Ausgangswerte im Plasma bis zum 4. postoperativen Tag oft etwas höher.

Sulfonamidverabreichung führte im Plasma sowohl bei intravenöser wie bei intragastrischer Applikation zu einem sehr rasch einsetzenden und anhaltenden Absinken der BSP-Konzentration. Die Gegenüberstellung des letzten Wertes unmittelbar vor und des niedrigsten Wertes innert 20 min nach der Sulfonamidgabe wurde in der Tabelle vorgenommen. Ein fassbarer Effekt tritt schon bei wenigen mg in Erscheinung; der beobachtete Abfall erreicht bei Steigerung der Sulfonamiddosis sehr bald ein Maximum von etwa 60%, bezogen auf den Ausgangswert, welches auch bei massiver Dosierung offenbar nicht überschritten wird.

Die Abbildung zeigt einen typischen Versuch bei kanüliertem Choledochus. Bereits 5 min nach der Sulfonamidgabe ist die Wirkung auf den BSP-Gehalt des Plasmas voll ausgebildet und bleibt während der weiteren Beobachtungszeit von über 1 h erhalten. Die Gallensekretion wird volumenmässig nicht beeinflusst, und trotz der verminderten Blutkonzentration hält sich die Konzentration in der Galle und damit die Ausscheidungsgeschwindigkeit konstant. Diese beiden Grössen nehmen vorübergehend eher noch etwas zu.

Besprechung der Befunde. Nachdem *in-vitro*-Kontrollmessungen ergeben haben, dass Zusatz von Sulfisoxazol zu einer BSP-Plasmalösung die Messwerte nicht wesentlich beeinflusst, muss angenommen werden, dass Sulfonamide bei Kaninchen die Blutkonzentration von BSP im Verlauf von intravenösen Infusionen regelmässig und akut zu senken vermögen. Eine naheliegende Erklärung läge in der Annahme einer Diffusion des Farbstoffes ins Gewebe infolge Verdrängung vom Plasmaalbumin. Ein ähn-

[3] Gantrisin (Markenname).

[4] Madribon (Markenname).

[5] B. Seligson, J. Marino und E. Dodson, Clin. Chem. *3*, 638 (1957).

[6] A. E. Lewis, Amer. J. Physiol. *163*, 54 (1950).

[7] W. A. Silverman, D. H. Anderson, W. A. Blanc und D. N. Crozier, Pediatrics *18*, 614 (1956).

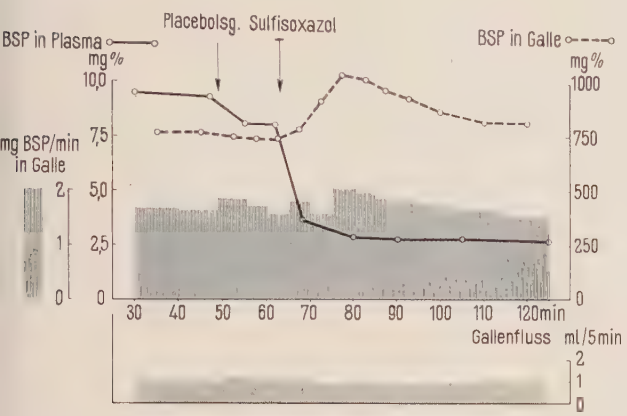
[8] R. C. Harris, J. F. Lucey und J. R. Maclean, Pedriatrics *21*, 875 (1958).

[9] W. A. Blanc und L. Johnson, J. Neuropath. exp. Neurol. *18*, 165 (1959).

[10] R. W. Brauer und R. L. Pessotti, J. Pharmacol. exp. Therap. *97*, 358 (1949).

[11] H. W. H. Andrews, J. Physiol., London *143*, 49 P (1958).

licher Mechanismus wird für die wahrscheinlich ungünstige Wirkung von Sulfonamiden beim Icterus neonatorum gravis in bezug auf das Entstehen eines Kernikterus vermutet[7–9]. Ein vermehrtes Abwandern von BSP ins Gewebe erklärt die vorliegenden Befunde jedoch insofern nicht, als die Sekretion trotz herabgesetzten Blutgehalts mit unverminderter Geschwindigkeit weitergeht. Offensichtlich stellt sich ein neues Gleichgewicht ein mit Erhöhung der BSP-Clearance auf ungefähr das Doppelte der Norm.



Infusion von 0,75 mg/kg/min BSP am Kaninchen. Während das Lösungsmittel von Sulfisoxazol (Placebo) ohne wesentlichen Einfluss bleibt, führt 267 mg/kg Sulfisoxazol i. v. zu einem akuten Abfall der BSP-Blutkonzentration. Die BSP-Sekretion hingegen wird vorübergehend eher noch beschleunigt

Eine Kreislaufwirkung der Sulfonamide von dieser Grössenordnung kommt nicht in Frage. Entweder wird die Farbstoffaufnahme im Bereiche der Leber erleichtert oder der Transport durch die Leberzellen hindurch wird irgendwie beschleunigt. Vermutlich handelt es sich um einen physikalisch-chemischen Vorgang. *In-vitro*-Versuche haben nämlich gezeigt, dass in Gegenwart von Plasma die Aufnahme von BSP durch Leberschnitte verzögert wird[10,11]. In Analogie zum Bilirubin, welches durch Sulfonamide von seiner Eiweissbindung verdrängt wird, kann vermutet werden, dass Sulfonamide auch die BSP-Eiweiss-Bindung irgendwie lockern und damit die Aufnahme in der Leber erleichtern, auch wenn es in den übrigen Gefässgebieten nicht zu einem vermehrten Abwandern ins Gewebe kommt.

Vielleicht besteht zwischen BSP und Bilirubin noch eine weitergehende Ähnlichkeit in dem Sinne, dass auch die Bilirubin-Clearance durch Sulfonamide gesteigert würde. Damit könnten die niedrigen Bilirubinwerte bei Sulfonamid-behandelten Frühgeburten[8] zwanglos erklärt werden. Entsprechende Untersuchungen mit Bilirubin sind im Gange.

M. Piller

Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, 4. April 1960.

Summary

Investigations in the rabbit demonstrate that even low doses of sulfonamides increase BSP clearance to about twice its normal level.

Antioxidant Activity of Mouse Liver and Kidney Extracts

Antioxidants have been postulated to play a central role in cellular metabolic processes by preventing spontaneous oxidative reactions which may yield products deleterious to the cell[1]. They may be of specific importance in regulating melanin formation by mammalian pigment cells[2,3], and in stabilizing adrenaline within the adrenal medulla[4]. As yet, little is known concerning the chemical nature of tissue antioxidants, particularly with regard to their qualitative and quantitative variation among different mammalian tissues. Several investigators have clearly demonstrated the ability of aqueous extracts of mammalian skin to inhibit the autoxidative conversion of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) to melanin *in vitro*[2,3,5]. During a recent study designed in part to characterize the chemical nature of inhibitory substances in skin extracts[3,6], parallel examination of mouse liver and kidney extracts was made for comparative purposes. The results are summarized in the present report.

The technics were essentially those reported previously[6]. Briefly, livers and kidneys were removed from adult C3H mice, dissected free of adhering fat, weighed, and suspended in cold double glass-distilled water to yield 50 mg wet weight of tissue/ml. Following homogenization in a chilled Potter-Elvehjem homogenizer, the tissue extracts were stored at – 20°C. Thawed extracts were centrifuged at 12,800 × *g* for 15 min at 0°C, and an aliquot of the supernatant was tested for inhibition of DOPA autoxidation; dry weight of tissue extract was determined for each sample. The test system consisted of 1 ml 5×10^{-3} *M* L-DOPA, 3 ml 0·05 *M* KH_2PO_4-Na_2HPO_4 buffer (pH 7·4), 0·1 ml $1{\cdot}6 \times 10^{-4}$ *M* $CuSO_4$, and water and/or tissue extract to a final volume of 5·1 ml. All reactions were carried out in calibrated test tubes, which were incubated at 37°C. Progress of melanin formation was followed by taking hourly readings on a Klett-Summerson colorimeter with a KS-42 (blue) filter. The percent inhibition of DOPA autoxidation by tissue extracts was calculated as a function of experimental and control values at the fourth hour of incubation. Precipitation of proteins was performed by adding 5 *M* trichloroacetic acid (TCA) to tissue extracts (final concentration TCA = 0·8 *M*). Following centrifugation, the precipitate was dissolved in a volume of 0·1 *N* NaOH such that the pH did not exceed 9·0; the resulting mixture was neutralized with HCl. Neutralization of the supernatant was accomplished with NaOH. The fractions thus obtained were tested for action on DOPA autoxidation. Tissue extracts were also tested for heat stability, dialyzability, and reversibility of inhibitory activity by sulfhydryl blocking agents[6].

In confirmation of Hirsch[7], liver and kidney extracts produced a marked inhibition of DOPA autoxidation. Liver yielded 9·1 ± 0·3 mg dry weight of extract from 50 mg wet weight, and the percentage inhibition of DOPA autoxidation was 56·4 ± 3·7 per 0·5 mg dry weight of extract (means ± mean S. E. based on 6 determinations).

[1] H. M. Hirsch, in, Pigment Cell Biology (M. Gordon, Ed., Academic Press, Inc., New York 1959), p. 327.

[2] P. Flesch and S. Rothman, Science *108*, 505 (1948).

[3] W. C. Quevedo, Jr. and J. E. Isherwood, Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. *3*, 54 (1959).

[4] D. G. Humm, M. Roeder, M. Landew, and E. E. Clark, Brit. J. Pharmacol. *10*, 163 (1955).

[5] P. Flesch, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. *70*, 136 (1949).

[6] W. C. Quevedo, Jr. and J. E. Isherwood, J. Invest. Derm., in press.

[7] H. M. Hirsch, Cancer Res. *15* 249 (1955).

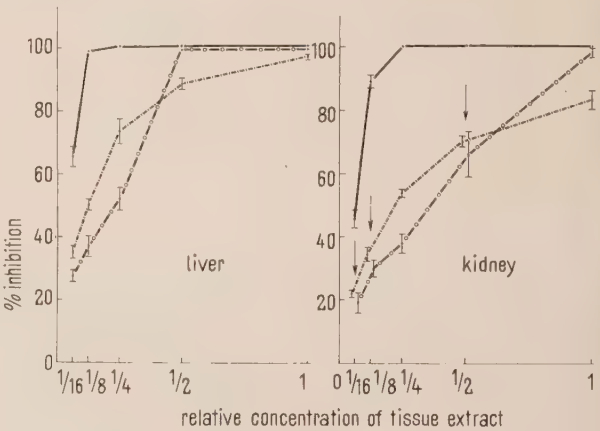
Corresponding determinations for kidney were $6{\cdot}1 \pm 1{\cdot}8$ and $57{\cdot}3 \pm 1{\cdot}8$, respectively. Expressed on the same basis, inhibition by mouse diaphragm was 28%, and by human and mouse skin 18%[6]. The inhibition by liver and kidney extracts was partly reversible by the addition of sulfhydryl blocking agents (Fig.). The maximum reduction of inhibition by sulfhydryl reagents was 60–70% for both liver and kidney. Our recent preliminary estimations of water-extractable -SH derived from 50 mg wet weight of tissue yielded values of 0·25 μM for liver and 0·18 μM for kidney[8]. A previous study of inhibition of DOPA autoxidation by liver and kidney extracts failed to demonstrate an -SH component of the inhibitor[7]; similarly, manometric studies of antioxidant activity of plasma proteins[9] and adrenal medulla[4] failed to reveal an -SH factor. The demonstration of an active sulfhydryl fraction in the present study might be the result of the differences in method and/or the establishment of a correct molar relationship between inhibitor and -SH reagents (Fig.). It is noteworthy that corrections had to be made throughout for the effect of -SH blocking agents on the DOPA system; both iodoacetamide and iodosobenzoate tended to accelerate DOPA autoxidation, whereas *p*-chloromercuribenzoate inhibited the process.

A loss in inhibitory activity of 40–60% occurred when liver and kidney extracts were placed in a boiling water bath for 20 min. The inhibitory fraction which survived boiling was almost entirely non-reversible by sulfhydryl reagents. These findings suggest that aqueous liver and kidney extracts, like those of skin and diaphragm[6], contain a complex of antioxidants consisting of at least two major fractions; one, heat-labile and -SH in nature; a second, non-SH and heat-stable. The bulk of inhibitory substances in liver and kidney extracts remained undialyzed after 48 h dialysis against distilled water in the cold. Control liver extracts produced a 52% inhibition of DOPA autoxidation per 0·5 mg dry weight of tissue extract, whereas dialyzed extracts inhibited 45%; similar values for kidney extracts were 60% and 45%, respectively.

Treatment of liver and kidney extracts with TCA suggested that the inhibitory complex was almost entirely proteinaceous in nature. Whereas 1 ml of liver or kidney extract inhibited DOPA autoxidation 100% (Fig.), the supernatants of both organ extracts following treatment with TCA (4 determinations each) inhibited less than 8%, and in half the cases enhanced DOPA autoxidation by about 10%. Conversely, the resuspended protein precipitates from 1 ml of liver or kidney extract inhibited 93% and 50%, respectively. Addition of iodosobenzoate to the resuspended precipitates lowered their inhibitory activity by 47% for liver and 67% for kidney, strongly suggestive of an involvement of protein -SH as part of the inhibitory complex.

A role of protein -SH in the inhibition of DOPA autoxidation was further supported by experiments with crystalline bovine serum albumin (BSA). This sulfhydryl-containing protein, when added to the test system in amounts of 0·33 to 33 mg, produced a marked inhibition of DOPA autoxidation. However, the effect of BSA on the DOPA system was difficult to interpret, for the inhibition was found to decrease with increasing concentration of BSA (inhibition by BSA: 0·33 mg = 47%; 8·2 mg = 63%; 33 mg = 21%; 66 mg = − 12%). As indicated, the addition of sufficient amounts of BSA (66 mg) to the test system actually enhanced DOPA autoxidation. Iodosobenzoate brought about a reduction of inhibition which increased from 30% to 60% with decreasing concentration of BSA. Although the effect of BSA on DOPA autoxidation is obviously quite complex[10,11], it may be concluded that pure proteins under specific conditions can act as antioxidants, and that part of this activity is attributable to protein -SH.

It would appear, therefore, that antioxidants capable of inhibiting autoxidation of DOPA *in vitro* are widely distributed among mammalian tissues and are at least partly proteinaceous in nature[1]. Our findings suggest that protein -SH may be of greater importance in antioxidant activity of tissue extracts than heretofore thought[1]. Only fragmentary evidence is available concerning the functions of tissue antioxidants in metabolic processes of living cells. It is clear that various organs contain different amounts of these substances, and it may be of significance that tumor tissues from mice[1] and blood plasma from human cancer patients[12] are deficient in antioxidants. The postulated role of antioxidants in melanin formation by mammalian melanocytes[2,3] and in the stabilization of adrenaline within the adrenal medulla[4] may well represent specific functions of a more general system of biological control. However, additional work is necessary to critically test Hirsch's interesting suggestion that antioxidants are part of a mechanism of cellular stabilization protecting the cell against spontaneous formation of free radicals, mutagens, carcinogens, and other deleterious substances[1].



Effect of sulfhydryl reagents on inhibition of DOPA autoxidation by liver and kidney extracts. Mean values of inhibition are plotted together with mean standard errors based on 9, 5, and 4 determinations, respectively, for tissue extract (·—·), tissue extract +0·1 mg iodosobenzoic acid (–·–·–), and tissue extract + 0·1 mg *p*-chloromercuribenzoic acid (›—‹—‹). A maximum of 1 ml of tissue extract was added to the test system. Several points (arrows) have been shifted slightly to permit clear illustration of data

We wish to thank Dr. C. Carruthers of Roswell Park Memorial Institute and Dr. H. M. Hirsch of University of Minnesota for reading the manuscript and for valuable suggestions.

W. C. Quevedo, Jr. and J. E. Isherwood

Biological Station, Roswell Park Memorial Institute, Springville (N. Y.), December 7, 1959.

[8] I. M. Kolthoff, W. Stricks, and L. Morren, Analyt. Chem. *26*, 366 (1954).

[9] C. Monder, J. N. Williams, Jr., and H. A. Waisman, Arch. Biochem. Biophys. *75*, 46 (1958).

[10] J. F. Scaife, Canad. J. Biochem. Physiol. *37*, 1049 (1959).

[11] C. Monder, J. N. Williams, Jr., and H. A. Waisman, Arch. Biochem. Biophys. *72*, 271 (1957).

[12] C. Monder and H. A. Waisman, Cancer Res. *19*, 268 (1959).

Zusammenfassung

Die hemmende Wirkung wässeriger Leber- und Nierenextrakte von Mäusen auf die DOPA-Auto-Oxydation wurde geprüft. Leber- und Nierenwerte waren von gleicher Grössenordnung und etwa dreimal grösser als die früher für Mäuse- und Menschenhaut bestimmten Werte. Der Hemmfaktor besteht zum grossen Teil aus Eiweiss und konnte in einen -SH-Gruppen enthaltenden, hitzeempfindlichen Teil und einen -SH-Gruppen-freien, hitzestabilen Teil getrennt werden. Die mögliche Bedeutung solcher Hemmstoffe für die Zelle wird erörtert.

On the Elimination of Chlorprothixene in Rat and Man

Chlorprothixene[1], the trans isomer of 2-chloro-9-(3-dimethylaminopropylidene)-thiaxanthene, hydrochloride, is a new tranquillizing drug, the pharmacological properties of which have been reported previously[2,3] and which has been found to have promising clinical properties[4–7]. It is an analogue to chlorpromazine in which the phenothiazine ring system has been replaced by the thiaxanthene ring system to which the side chain is attached by a double bond. Like chlorpromazine it shows a fairly high ultraviolet absorbancy. UV maxima are obtained at 230, 268, and 325 mμ in aqueous solution. It is easily extracted from an alkaline aqueous solution into nonpolar solvents such as heptane or ether, and from these solvents into dilute acid. On addition of an equal volume of concentrated sulfuric acid to an aqueous solution, a weak salmon pink colour is obtained. The solution shows a main absorbance maximum at 389 mμ and additional maxima at 492 and 518 mμ. Furthermore, the solution shows intense yellow fluorescence (maximum at 559 mμ) on irradiation with UV light (around 3000–4000 Å). All these properties may be used for analysis qualitatively and quantitatively.

On analysis of urine from rats given the drug parenterally or orally, and from patients taking the drug orally, a sulfuric acid reaction as given above was found with extracts. The UV absorbance curves were not the same as obtained for the drug, however. Thus the presence of a metabolite was suspected and this was suggested to be the corresponding sulfoxide, in analogy to the case with a number of phenothiazine tranquillizers[8–11]. Synthetic chlorprothixene sulfoxide showed UV absorbance maxima at 221 and 261 mμ and a 'shoulder' at 310 mμ, and the UV absorbance curve was identical with the curves obtained for the urine extracts. On carrying out the sulfuric acid reaction, a salmon pink colour was obtained and the absorbance curve showed maxima at about 390 and 500 mμ; which is the same finding as for the urine extracts. No fluorescence in UV light was obtained for the synthetic sulfoxide or the urine extracts. On paper-chromatography in butanol-acetic acid-water, urine extracts gave a UV absorbing spot in the same position as the synthetic sulfoxide, R_f about 0·70, whereas the unchanged drug gave R_f about 0·75 and showed yellow fluorescence in long wave UV light after treatment with 50% sulfuric acid. No such reaction was obtained for the sulfoxide or the urine extracts.

After elution of the spot obtained with urine in dilute acid, a UV absorbance curve identical to that of the sulfoxide was obtained. On paper chromatography in 0·067 *M* phosphate buffer[12], pH 7·5, the sulfoxide and the urine extracts gave R_f about 0·70 and the drug R_f about 0·10. The identity of the urinary metabolite with the sulfoxide was thus concluded.

On quantitative analysis of the output of sulfoxide in urine (modified extraction according to Salzman and Brodie[8] for separation of unchanged drug and sulfoxide; acetate buffer pH 5·4 was used), up to about 5% of the dose was recovered in 48 h on oral administration to rats (single dose, 25 mg/kg). In man 5·9–29·0%, with a mean of 11.7%, was recovered in 24 h (on continued administration with doses up to 100 mg thrice daily).

On analysis of feces (same method as for urine) unchanged drug as well as the sulfoxide was found, on oral administration in man. The total elimination in feces varied from 0–41% of the dose, somewhat more of the unchanged drug being eliminated. No other metabolites have been identified so far. In rats, only the sulfoxide metabolite was found in feces, and in amounts from 1–7% of the dose in 48–72 h on both oral and parenteral administration (single dose).

In the bile from bile-fistula-rats (light urethane-ether anesthesia), only sulfoxide was found and in amounts of the same order as in feces, after oral or intramuscular administration. After intravenous injection, however, up to 24% of the dose was recovered as sulfoxide from the bile within 7 h.

No detectable amounts of drug or sulfoxide were found in blood on oral administration to man, nor could the drug be determined in blood following oral or intramuscular administration of 25 mg/kg or intravenous injection of 5–10 mg/kg to rats. 2–5 min after intravenous injection of 25 mg/kg, a blood concentration in the order of 3–1 μg/ml was observed. The drug had disappeared from the blood in less than 10 min after injection.

L-G. Allgén, B. Jönsson,
B. Nauckhoff*, M-L. Andersen,
I. Huus, and I. Møller Nielsen**

Department of Clinical Chemistry and Department K II, Beckomberga Mental Hospital, Bromma (Sweden) and Research Laboratories of H. Lundbeck & Co. A/S, Copenhagen (Denmark)**, March 31, 1960.*

Zusammenfassung

Die Ausscheidung des neuen Neuroleptikums, Chlorprothixen, bei Menschen und Ratten wurde in Urin, Galle und Faeces untersucht und als einziges Abbauprodukt Chlorprothixen-Sulfoxyd gefunden. Ausscheidungsprodukte in % der verabreichten Dosis: Beim Menschen (orale Verabreichung) im Urin: 5–29% Sulfoxyd, Faeces: 0–41% unveränderter Stoff + Sulfoxyd. Bei der Ratte (orale oder parenterale Verabreichung) im Urin: bis zu 5% Sulfoxyd, Faeces: 1–7% Sulfoxyd, keine unveränderte Substanz, Galle: bis zu 24% Sulfoxyd.

[1] Truxal (N 714 trans, HCl), produced by H. Lundbeck & Co., Copenhagen (Denmark).

[2] P. V. Petersen, N. Lassen, T. Holm, R. Kopf, and I. Møller Nielsen, Arzneim.-Forsch. *8*, 395 (1958).

[3] I. Møller Nielsen and K. Neuhold, Acta pharmacol. toxicol. *15*, 335 (1959).

[4] E. Madsen and J. Ravn, Nord. psykiat. Tidskr. *13*, 82 (1959).

[5] I. Møller Nielsen, P. V. Petersen, and J. Ravn, Ugesk. læger *121*, 1433 (1959).

[6] M. Alsén and T. S:son Frey, Sv. Läkartidn. *56*, 3344 (1959).

[7] O. H. Arnold, Wiener med. Wschr. *109*, 892 (1959).

[8] N. P. Salzman and B. B. Brodie, J. Pharmacol. exp. Therap. *118*, 46 (1956).

[9] L-G. Allgén, B. Jönsson, A. Rappe, and R. Dahlbom, Exper. *15*, 318 (1959).

[10] S. S. Walkenstein and J. Seifter, J. Pharmacol. exp. Therap. *125*, 283 (1959).

[11] L-G. Allgén, Paper read at the 7th Scand. Congr. on Clin. Chem. and Clin. Physiology, Helsingör (Denmark), 1959.

[12] T. Berti and L. Cima, Arch. int. Pharmacodyn. *98*, 452 (1954).

Synthesis and Biological Activity of Peptides Related to Bradykinin

Bradykinin has been obtained from plasma globulins by the action of various enzymes[1]. The amino acid composition[2,3], the structure[4], and the biological properties[3] of the pure product have recently been studied by Elliott, Horton, and Lewis. We wish to report on the synthesis and the biological activity of several peptides related to bradykinin (Table).

Structure of peptides A–F

H-L-Arg-L-Pro-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-L-Pro-L-Phe-L-Arg-OH A
H-L-Arg-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-L-Pro-L-Phe-L-Arg-OH . . B
H-L-Arg-L-Pro-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-L-Phe-L-Arg-OH . . C
H-L-Arg-L-Pro-L-Pro-L-Phe-Gly-L-Ser-L-Phe-L-Arg-OH . . D
H-L-Arg-L-Pro-Gly-L-Pro-L-Phe-L-Ser-L-Phe-L-Arg-OH . . E
H-L-Arg-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-L-Phe-L-Arg-OH . . . . . F

CBO-(nitro)Arg-Pro-OH (I) was condensed with H-Pro-Gly-NHNH-CTO (II)[5] by dicyclohexylcarbodiimid. By selective splitting of the CTO group and treatment with nitrous acid, CBO-(nitro)Arg-Pro-Pro-Gly-N_3 (III) was obtained. Condensation of CBO-Phe-Ser-N_3 (IV) with H-Pro-Phe-(nitro)Arg-OBzN (V)[5] and selective splitting of the CBO group yielded H-Phe-Ser-Pro-Phe-(nitro)Arg-OBzN (VI), which was condensed with III to CBO-(nitro) Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-(nitro)Arg-OBzN(VII). Catalytic hydrogenation of VII yielded A. By using CBO-(nitro)Arg-Pro-Gly-OH (VIII) (from I and H-Gly-OH) instead of III, B was obtained. By condensing IV with H-Phe-(nitro)Arg-OBzN (IX) and splitting the CBO group, H-Phe-Ser-Phe-(nitro)Arg-OBzN (X) was obtained; by condensation with III, followed by catalytic hydrogenation, this led to C. Condensation of IX with CBO-Gly-Ser-N_3 followed by splitting of the CBO group and condensation with CBO-Pro-Phe-OH gave a hexapeptide, which, after splitting of the CBO group, was condensed with I. Catalytic hydrogenation of the protected octapeptide gave D. Condensation of I with H-Gly-Pro-OH followed by condensation with X and catalytic hydrogenation gave E. Condensation of VIII with X, followed by catalytic hydrogenation gave F. All the intermediary and final products were obtained in an analytically pure state.

The biological activity of the peptides A–F was first determined on the isolated guinea pig ileum. The peptides C, D, E, and F were without effect in doses up to 2.5 μg/ml, whereas A and B produced a slow contraction in concentrations as small as 1 ng/ml and 100 ng/ml respectively. Boiling with concentrated HCl or incubation with guinea pig serum destroyed the activity, whereas pretreatment of the muscle with atropine and/or an antihistamine agent (Thenalidine) only slightly interfered with the activity.

The nonapeptide A was further investigated using tests known to be sensitive for bradykinin[1,3,6]. The following results were obtained: On the rabbit duodenum, the concentration required to elicit contraction was 1 ng/ml. To produce a depressor response in anesthetized rabbits, rats, guinea pigs, cats, and dogs, the doses ranged from 200 to 400 ng/kg. Bronchoconstriction in the guinea pig occurred with 200 ng/kg. An effect on capillary permeability to a circulating dye (Evan's Blue) in guinea pigs after intradermal injection was observed with 1 ng.

On a molar basis, the nonapeptide A was more active than histamine (ileum, bronchial muscle, and capillary permeability of the guinea pig) and acetylcholine (duodenum of the rabbit, blood pressure of the rabbit and dog).

The nonapeptide A is therefore one of the most active biological substances exerting a bradykinin-like effect. Further work will demonstrate if it is identical with or closely similar to pure bradykinin.

R. A. Boissonnas, St. Guttmann,
P.-A. Jaquenoud, H. Konzett, and E. Stürmer

Pharmazeutisch-chemisches und pharmakologisches Laboratorium der Sandoz AG., Basel, June 2, 1960.

Zusammenfassung

Die Synthese von 6 Polypeptiden aus den im Bradykinin vorkommenden Aminosäuren wird beschrieben. Das Nonapeptid H-L-Arg-L-Pro-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-L-Pro-L-Phe-L-Arg-OH zeigte hohe Bradykinin-ähnliche Wirksamkeit in verschiedenen biologischen Testen.

[1] M. Rocha e Silva, *Biochemistry and Pharmacology of Bradykinin*, in M. Schachter, *Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels* (Pergamon Press, Oxford–London–New York–Paris 1960).

[2] D. F. Elliott, G. P. Lewis, and E. W. Horton, Biochem. J. *74*, 15 P (1960).

[3] D. F. Elliott, E. W. Horton, and G. P. Lewis, J. Physiol. *150*, 6 P (1960).

[4] D. F. Elliott, paper read to the Biochemical Society (London) on April 8, 1960. We thank Dr. Elliott for kindly giving us some of his results before communication.

[5] CBO = carbobenzoxy; CTO = carbo-ter-butoxy; OBzN = *p*-nitrobenzoxy.

[6] H. O. J. Collier, J. A. Holgate, M. Schachter, and P. G. Shorley, J. Physiol. *149*, 54 P (1959).

Muscle Atrophy Following Section of the Spinal Cord in the Rat

Fischer[1], Solandt and Magladery[2] observed that the course of muscle atrophy, following transection of the spinal cord, is biphasic. During the first 10–14 days following complete transection of the cord and unilateral denervation, the gastrocnemius-soleus muscle was found to atrophy on the 'plegic' side (i.e. after lesion of the upper motor neuron) at a similar rate as on the side of denervation (i.e. after lower motor lesion). Later, however, the plegic muscles gained in weight, so that 56 days after the operation their weight returned almost to initial values. In neither of these reports, however, have changes in total body weight occurring in the course of the experiment been taken into account. It is plausible to assume that if there are any changes in body weight, they might influence the interpretation of these results.

For this reason experiments were performed in an identical manner as those of the above authors. The spinal cord was sectioned at Th_8 in female rats (190–205 g body weight) and at the same time the sciatic nerve was cut and its central stump ligated to prevent regeneration of nerve axons. The soleus and gastrocnemius muscles were then excised in different groups of animals 7, 14, 28 and, 56 days after the operation. The body weight of all animals was carefully registered. As can be seen from the Figure,

[1] E. Fischer, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *47*, 277 (1941).

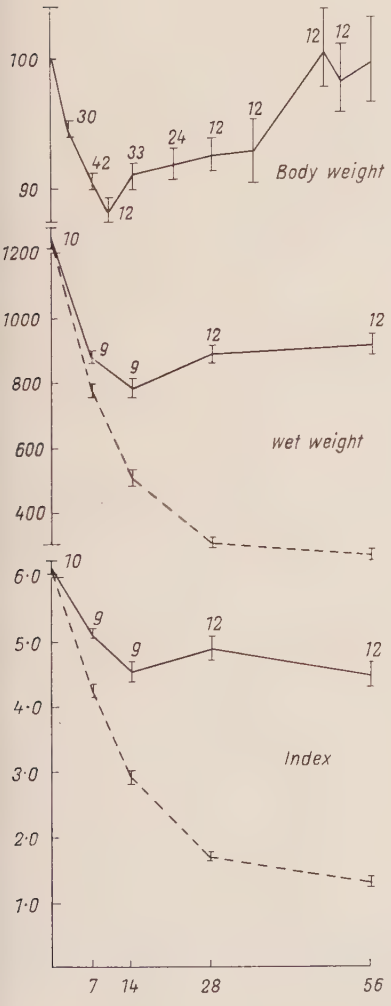
[2] D. Y. Solandt and J. W. Magladery, J. Neurophysiol. *5*, 373 (1942).

there is a distinct loss of body weight during the first 7–9 days which is later followed by a gain in body weight, so that 56 days after the operation the initial body weight is regained.

It was found that during the first phase, the atrophy on the plegic side progressed at the same rate as that of the denervated muscles (Figure). No differences were noted between the wet and dry muscle weights.

Following this, there was a gradual but significant gain in weight in both the gastrocnemius and soleus 56 days after transection of the cord, as compared with their lowest values. These results are thus in accord with the findings of FISCHER[1], SOLANDT and MAGLADERY[2].

However, the evaluation of results in this type of experiment in absolute units only (mg) does not take into account the changes due to body weight which can influence the muscle weights. In order to elucidate the role played by the temporary loss of body weight in the above changes, all the muscle weights were calculated as an index: $\frac{\text{muscle weight in mg}}{\text{body weight in g}}$. It was found that during the first phase following section of the spinal cord, atrophy of the plegic muscles does actually occur, i.e. that the muscles lose weight at a faster rate than would correspond to the loss in body weight. But during the second part of the experiment, the index values do not exhibit a tendency to increase, i.e. the absolute gain in weight of the soleus and gastrocnemius is proportional to the gain in body weight (Figure).



The course of changes in body weight, muscle wet weight, and index of muscle to body weight in rats, 7, 14, 28, and 56 days after complete transection of the spinal cord and unilateral section of the sciatic nerve. Body weight expressed as percentage of initial values, muscle wet weight given in mg. Continuous line: lower motor neuron intact; dotted line: lower motor neuron transected. Vertical lines represent standard error of the mean, numerals give number of animals in each group. Abscissa: time after operation in days

It is thus possible to explain the restitution of weight of the gastrocnemius and soleus, i.e. muscles investigated by FISCHER, SOLANDT, and MAGLADERY, in the first place by the increase of body weight of the experimental animals.

P. HNÍK

Physiological Institute, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, August 26, 1959.

Zusammenfassung

Nach Myelotomie verläuft die Muskelatrophie in zwei Phasen. In der ersten Phase stimmt der Gewichtsverlust der Muskeln mit demjenigen nach Denervation überein. Dagegen erfolgt in der zweiten eine Gewichtszunahme, die durch die analoge Gesamtzunahme des Körpergewichts erklärt wird.

PRO EXPERIMENTIS

A Method of Determining Electrophoretic Mobilities of Antibodies

The localization of antibody activity after electrophoresis has been determined by several methods. It has been done using free electrophoresis[1], paper electrophoresis[2,3], and agar gel electrophoresis[4]. In the latter cases[2–4] the antibody activity has been determined in fractions of the separated serum obtained by elution from the paper or the agar after the electrophoretic run. A method has also been published, however, with which hemagglutinins can be localized after paper electrophoresis by the disposal of red blood cells directly on the paper after the electrophoretic run[5]. This method – although convenient – has been reported not to be very sensitive and does not seem to allow a very precise localization of the antibodies[6]. The present report discusses a technique in which antibodies can be accurately localized by antigen-antibody reactions in basins placed in direct contact with the electro-separated material after the run.

Technique: The electrophoretic separation is performed in agar as described by WADSWORTH and HANSON[7]. Buffered agar of 1% is poured on a 8·2 × 8·2 cm photographic glass to which is attached by adhesive tape two glass pieces 2 × 8·2 cm on opposing sides. The material to be analyzed is mixed with agar and placed in 3 mm wide cut basins. After the separation is complete, the glass end pieces, which provide contact with the buffer in the electrode vessels, are removed. A matrix (78 × 15 mm) of 3 mm thick plexiglass, in which basins 3 mm in diameter are formed, is placed on top of the agar over the separated material (Fig.). The basins in the matrix are placed so that they cover areas which overlap each other along the axis of separation. It is important to eliminate confluence of the material between these different basins. Therefore the matrix is provided with a piece of 0·5 mm thick waterproof tape at each end and melted agar of

[1] J. R. CANN, R. A. BROWN, J. G. KIRKWOOD, P. STURGEON, and D. W. CLARKE, J. Immunol. *68*, 243 (1952).

[2] B. D. JANKOVIC and H. W. KRIJNEN, Nature *171*, 982 (1953).

[3] R. PAYNE and Q. B. DEMING, J. Immunol. *73*, 81 (1954).

[4] R. FAURE, J.-M. FINE, M. SAINT-PAUL, A. EYQUEM, and P. GRABAR, Bull. Soc. Chim. biol. *37*, 783 (1955).

[5] G. BERG, W. FRENGER, and F. SCHEIFFARTH, Klin. Wschr. *33*, 767 (1955).

[6] A. SEMLOW, Z. Immun-forsch. *116*, 215 (1958).

[7] C. WADSWORTH and L. Å. HANSON, Int. Arch. Allergy, in press (1960).

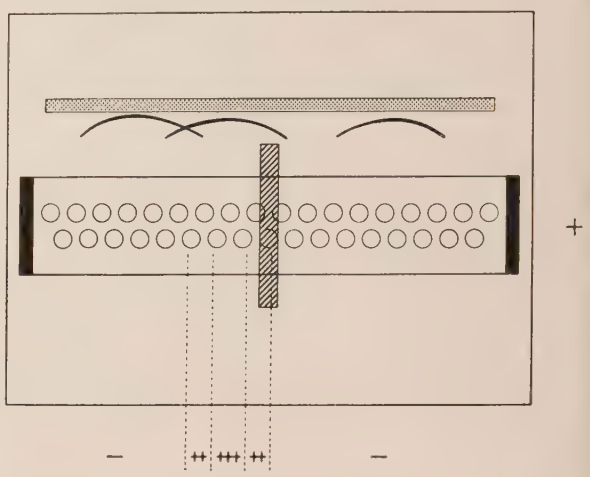
0·5% is poured between the matrix and the agar layer to seal the basins. After the electrophoresis, these basins are about 1/3 filled with saline. The plate is then kept at 37°C for 30 min. To determine hemagglutinating antibodies the basins are then filled up with a 2% suspension of red cells antigenically corresponding to the antibodies to be demonstrated. After an additional period of time (20–60 min) at 37°C, the material in each basin is well mixed with a capillary pipette and the cell suspension is removed. A microscopic examination for agglutination is made. To determine the localization of the serum fractions after the electrophoretic separation, immunoprecipitation is performed. This is accomplished by application of the corresponding immune serum in a basin (2 × 70 mm) cut parallel to the direction of the electroseparation and 4–6 mm from the starting basin (Fig.). The plate is then kept in a humid atmosphere at room temperature, and the next day, after the immune electrophoretic spectrum has developed, a photograph is taken before the matrix is removed.

Experimental: Control experiments were performed in order to determine if diffusion in the agar after the electrophoretic separation changed the localization of the substances to be detected. It was found that unseparated serum-agar containing the isoagglutinin anti-A showed strong agglutination of A-cells in the matrix basin which was situated directly above the serum agar basin. One basin on each side of this showed weak reactions, but each of these covered 1 mm of the serum basin. No agglutination was observed in the basins which were 1 mm from the serum basin even after several hours.

Using the method described, agglutinating antibodies could be electrophoretically localized with great accuracy. Separating human sera containing the isoagglutinins anti-A and anti-B, these antibodies could be localized in the β_1- and β_2-globulin regions as seen in the Table. Agglutinating anti-Rh antibodies (anti-D) were mainly seen in the β_1- and somewhat out in the β_2-globulin region when using 0 Rh(+) red cells in saline, but the agglutination was extended to both sides especially into the γ-globulin region, when papain-treated cells were used instead (Table). Incomplete anti-D antibodies could be demonstrated in the β_1-globulin region when 20% human albumin was added to the matrix basins instead of the saline. Using papainized cells agglutination was noted also in the β_2- and γ-globulin regions.

Antibodies could also be localized in material other than blood serum using this technique. Thus anti-A and anti-B isoagglutinins were found in colostrum in the area corresponding to the localization of the β_1- and β_2-globulins of serum. A more detailed report on these findings will follow[8].

Results were also obtained which indicated the possibility of localizing the presence of antibody activity other than agglutination. A serum with a high anti-streptolysin 0 titer was electro-separated, reduced streptolysin 0 was added to the basins in the plexiglass matrix, and after 30 min these were filled up with a 2% sheep red blood cell



Schematic drawing of an analysis detecting the electrophoretic mobility of antigens or antibodies The material to be separated is put in the central basin and the plexiglass matrix is placed on top of the agar, covering the separated material. The matrix basins are 3 mm wide and the distance between the center of two adjacent basins in one row is 4 mm. This distance forms the base of an isosceles triangle with 5 mm sides. A basin in the other row has its center in the third corner of this triangle. The immune serum corresponding to the separated material is filled in the longitudinal basin. The activity found (indicated by +) is localized by means of the immune electrophoretic spectrum

[8] L. Å. Hanson, in manuscript.
[9] L. Goreczky und N. Miklós, Z. Immun-forsch. *118*, 490 (1959).

Electrophoretic Localization of Antibodies

Serum Specimen	Corresponding Immune Reactant	Antibody Activity
		Hemagglutination
anti-A	A Rh(–)cellls in saline	
anti-B	B Rh(-)cells in saline	
anti-Rh (D) aggl.	0 Rh(+) cells in saline	
anti-Rh (D) aggl.	0 Rh(+) papain-treated cells	
anti-streptolysin 0	Reduced Streptolysin 0 (sheep cells as indicator)	anti-Hemolysis
Serum fractions as localized by immune electrophoresis		γ, β2, β1, α2, α1, alb.

suspension. The hemolytic activity of the lysin had been neutralized in the basins above the β_2-globulin region where the anti-streptolysin 0 antibodies were evidently localized after the electrophoresis (see Table).

It also seemed possible to localize hemolysins after electroseparation of a streptococcal culture filtrate by means of their lytic activity on red blood cells. The hemolysis could easily be read directly in the basins.

This method thus seems to allow an accurate determination of the localization of different antibody and toxin activity after electrophoresis. However, further work may be needed to develop the technique and to determine factors of importance for the results obtained; e. g. the amount of material separated has been reported to influence the distribution of activity determined[3,9].

The human red cells and sera were kindly supplied by Dr. L. Ryttinger, The Blood Bank, Sahlgren Hospital, Gothenburg.

L. Å. Hanson, V. Raunio, and C. Wadsworth

Department of Bacteriology, University of Gothenburg (Sweden) and Department of Microbiology, University of Turku (Finland), December 30, 1959.

Résumé

On expose une méthode simple par laquelle il a été possible de localiser exactement l'activité des anticorps ou des antigènes après électrophorèse. Cette méthode a été appliquée aux hémagglutinines du sérum et du lait, aux antitoxines et hémolysines.

STUDIORUM PROGRESSUS

Methods of Obtaining and Mode of Action of Stage Ontogenins

By G. K. Roussev[1]

In studying the connections between the preformed and epigenetical state of individual development, the necessity of applying new methods for this purpose[2] arises more and more.

Recently a number of authors have succeeded in producing specific disturbances at a clearly defined stage of embryonic development by making use of antimetabolites of nucleoproteid metabolism[3,4].

In 1954, I found a new biological method of obtaining bioactive substances influencing embryonic development[5]. I observed that, after conglutination of father-spermazozoa to the naked surface of the developing embryo of *Triturus cristatus*, the surrounding solution acquires new qualities. This solution stops the development of younger embryos submerged in it and at that same stage of the naked embryo; older embryos develop unhindered[6]. We supposed, that the action of the solution is due to the formation of substances which were named *stage ontogenins*, bearing a number corresponding to the number of the stage of the embryo from which they are obtained[7].

Together with G. Naidenova, experiments were performed to purify the native solutions of some ontogenins – 3, 4, 9, 10. Applying different biochemical methods for isolation, it was found that the action is due to the presence of strictly defined chemical substances[8] – for example by chromatogram and UV-absorption curve, the presence of phosphorus in the ester-bond of purified ontogenin 4 indicates that the latter is structurally similar to a deoxyribosenucleotid.

We had to get more data of the mode of action of the ontogenin.

Method. We worked with *Triturus cristatus* during its period of heat. The animals were caught at their natural breeding grounds and within 36 h the eggs were artificially fertilized by Hertwig's method, keeping instruments and materials sterile. The spermatozoa, both for fertilization and later for conglutination, were obtained by massaging the abdomen to cause an ejaculation which was afterwards diluted in Holtfretter solution. The experiments were carried out in small porcelain crucibles with waxed bottoms. The crucibles were placed in a gas chamber in an oxygen atmosphere at 100% relative humidity and 17–19°C.

The gelatinous envelope and the viteline membrane of the embryos, at different stages of development were removed in such a way as to cause a slight injury. The naked embryo in this way was rinsed for 10–15 min in already used triton blood serum and transferred to a 1·5 ml Holtfretter solution containing $1^0/_{00}$ glucose. This solution contained in suspension about 50000 spermatozoa recently ejaculated by the father-triton. The spermatozoa rapidly conglutinated to the surface of the naked embryo, especially to the injured parts. Usually after 4–8 h, the embryo was taken away and the solution was decanted and filtered.

The necessity of preservation of these conditions was proved in a series of experiments in which we changed some of the components and kept the rest constant. For ontogenins to be formed, it is necessary for the descending embryo to be without gelatinous envelope and vitelline membrane. If the envelopes are not removed, the spermatozoa cannot penetrate through them and we cannot establish any changes in the surrounding solution. This gave us the possibility to place uninjured embryos with the naked or injured ones – the development of the latter served us as a quick test to estimate the action of the ontogenin obtained by the first. It was usual that in one test two uninjured embryos, one young and the other at an older stage, were placed in the solutions together with the injured one.

It was found that the state of the naked embryo is of the greatest importance and that ontogenins are separated only at definite moments of the different stages and states of these embryos. For example, while maintaining all the conditions for obtaining ontogenins, we obtained ontogenin 4 out of 20 embryos in the stage 10 min after the beginning of the second cleavage till the moment of complete normal second cleavage. 40 naked embryos, 30 and 60 min after the second cleavage did not give ontogenins. Stage 2 gave ontogenins: one 25–45 min after fertilization, one $1^1/_2$–2 h, and one 6 h after fertilization. The embryos at stage 4 h after fertilization are inactive. Only in the beginning of the first cleavage Ontogenin 3 is separated. Stage 10, at the beginning of the gastrulation, and stage 12 at the moment, when the blastopore is closed to a slit, did not give ontogenins.

[1] Medical Research Institute Sofia and Institute of Morphology at the Bulgarian Academy of Science.

[2] C. H. Waddington, *Principles of Embryology* (Allen and Unwin, London 1956).

[3] K. B. Liedke, M. Engelmann, and S. Graf, J. exper. Zool. *127*, 201 (1954).

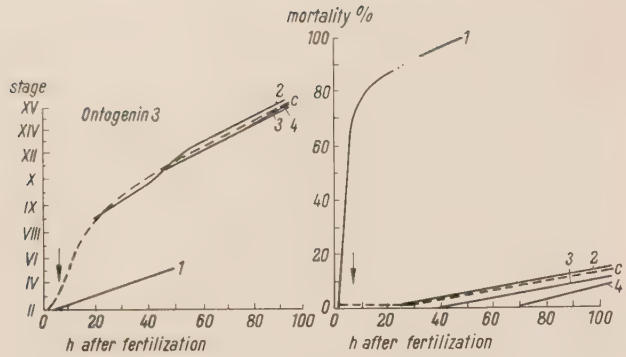
[4] S. Bieber, J. cell. comp. Physiol. *44*, 11 (1954).

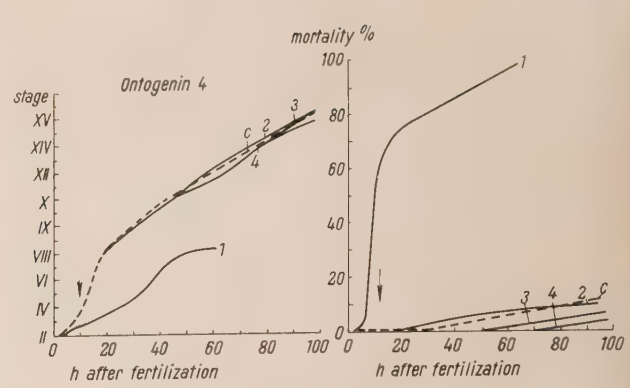
[5] G. K. Roussev, C. R. Acad. bulg. Sci. *4*, 94 (1956) (englisch).

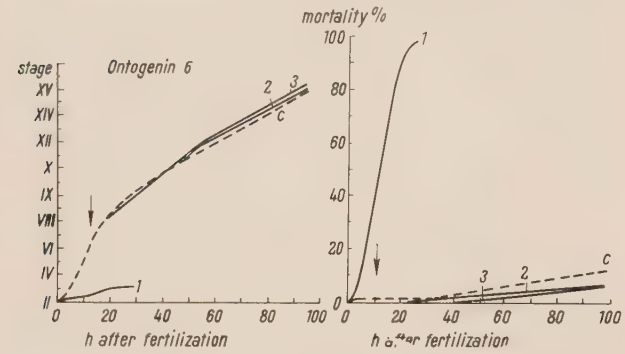
[6] G. K. Roussev, Bull. sect. sci. biol. med. Acad. Sci. Bulg. *1*, 88 (1957) (bulgarisch).

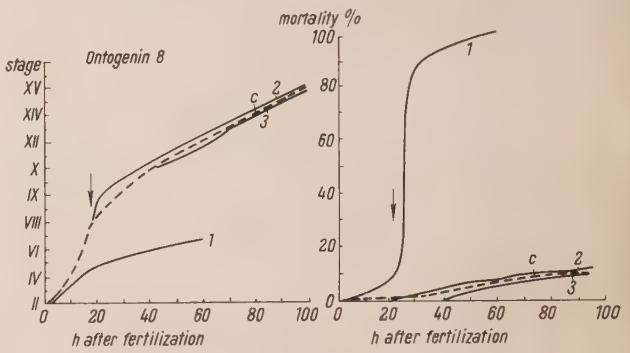
[7] A. Polister and H. Moore, Anat. Rec. *68*, 489 (1937).

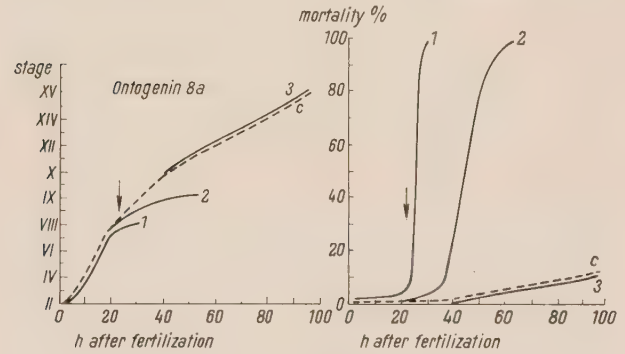
[8] G. K. Roussev, Prov. 4th Int. Congress Biochemistry Symp. VI-Bioch. of Morphogenesis (Disc.), in press (1958).

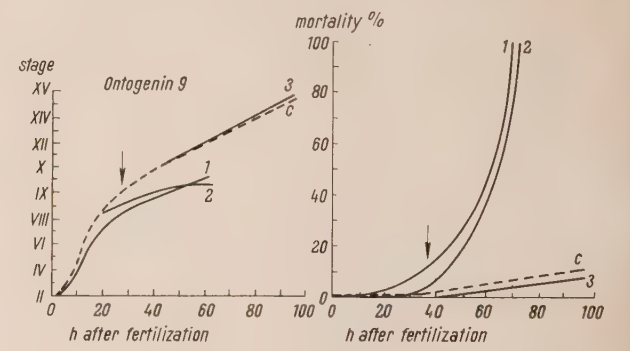

Ontogenin 3
stage
mortality %
h after fertilization

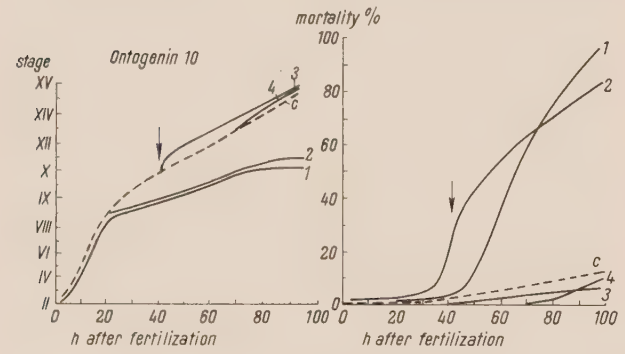

Ontogenin 4
stage
mortality %
h after fertilization

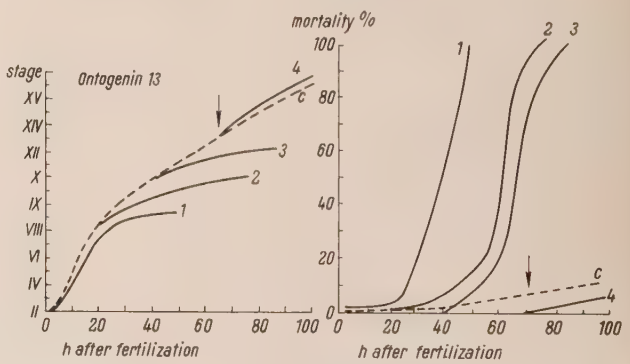

Ontogenin 6
stage
mortality %
h after fertilization

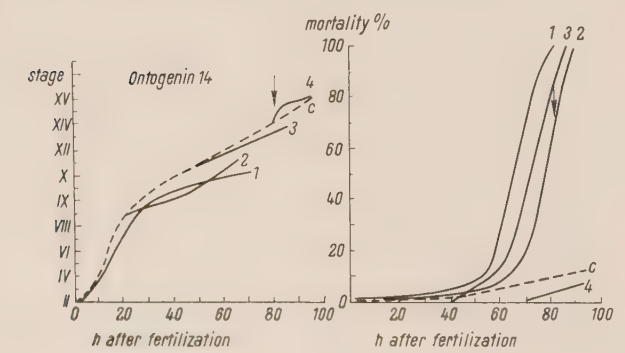

Ontogenin 8
stage
mortality %
h after fertilization

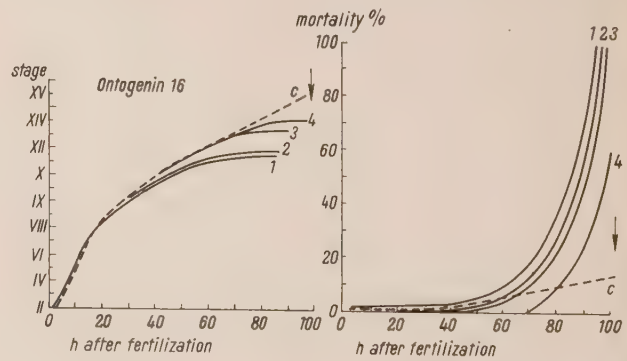

Ontogenin 8a
stage
mortality %
h after fertilization


Ontogenin 9
stage
mortality %
h after fertilization


Ontogenin 10
stage
mortality %
h after fertilization


Ontogenin 13
stage
mortality %
h after fertilization


Ontogenin 14
stage
mortality %
h after fertilization


Ontogenin 16
stage
mortality %
h after fertilization

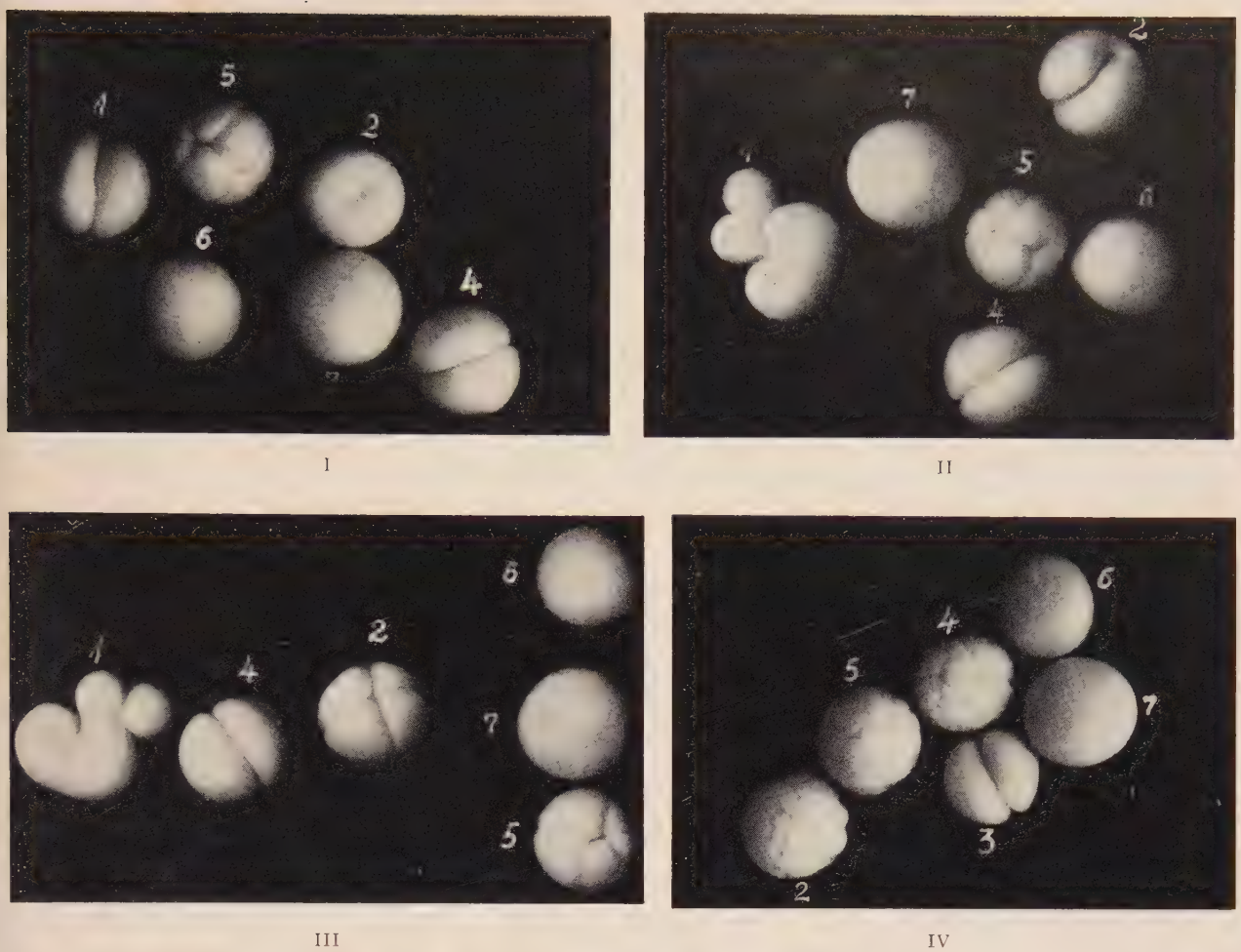


Fig. 2. The obtaining and action of the antimorulic ontogenin 3. Microphoto. Group of embryos: (1) injured or naked, (2–6) uninjured, after their simultaneous placing in the reacting container

I In the beginning of the experiment.
II After 15 min, the naked embryo (1) cleaves and is ahead of the control embryo by 40 min.
III After 40 min, embryo placed in the beginning of I cleavage (2) cleaves and is ahead of the control.
IV After 12 h, a two-blastomere zygote (3) from over-ripe egg.
V After 24 h, the embryo placed 2 h after fertilization had not developed (7), the later stages (5, 6,4) are normal, (3) delayed II cleavage.

Fig. 1. Action of the stage ontogenins, for every ontogenin:

In left: mortality % (for primary number) of the same embryos. The embryos stayed in the ontogenin-solutions 40 h, after which they were transferred to normal conditions ($t° = 19°$). The arrows show the moments of obtaining of the corresponding ontogenin. c – control – 60 embryos in Holtfretter solution with $1‰$ glucose.

In right: development of the growing embryos with vitteline membrane, put in the ontogenin solutions. 4 embryos [1–2 h after fertilization (1), one-early blastula (2), one-early gastrula (3), one-neural plate (4)] was placed together in 1·5 ml ontogenin solutions. Every ontogenin was proved in an average 30 experiments.

In another series of experiments, it was established that it is absolutely necessary for the coat of the embryos to be slightly injured.

The other conditions (father-spermatozoa, serum) are most favourable for obtaining ontogenins. It is necessary that the spermatozoa be alive, mobile, capable of fertilizing. The rinsing in the blood serum is not necessary for some stages (8,14).

We have established that an interval of 20–30 min after conglutination is necessary in order that the conglutinating solution may exert its strongest influence upon other embryos with envelopes. With constant conditions in our experiments, we obtained 22 ontogenins from the different stages of embryonic development of *Triturus cristatus*. Ontogenins 3, 4, 8, 10, and 14 were obtained utilizing spermatozoa of other individuals of *Triturus cristatus* (not the father), *Triturus vulgaris*, *Rana ridibunda*.

As with *Triturus cristatus* we obtained ontogenins in the same way from some stages of *Triturus vulgaris*[9].

After establishing the necessary conditions for obtaining ontogenins, an experiment was made to determine the ontogenetic specificity of the ontogenins obtained at different stages of the embryonic period. In 1·5 ml of every ontogenin in solution, 4 embryos were placed: one embryo 2 h after fertilization, one in the early blastula stage, one in the early gastrula stage, and one in the neural plate stage. The embryos stayed in the ontogenin solution 20 h, after which they were transferred to normal optimal conditions and were observed until the neural tube stage. For every ontogenin an average of 30 (15–40) experiments were performed. As seen from Figure 1, the growth of stages older than the naked embryos is quite normal. The younger stages, however, develop abnormally. Ordinarily the development was delayed or stopped, some characteristic disturbances being observed at every stage, such as influenced zygotes 1–6 h after fertilization, cleavage with unequal right and left halves; the grooves of the morulas regress and disappear and the blastulas have an upset animal-vegetative polarity. The gastrulas show a swelling of the blasopore. Microscopically, disturbances of mitosis, pyknosis of the nuclea, and vacuolization were discovered. If the ontogenin is obtained from an embryo of a more advanced stage of development, the quite young embryo placed in it develops normally in the beginning, but on reaching the stage of the naked embryo it perishes.

If, simultaneously with the naked embryo, we place in the solution embryos with vitelline membrane which have just begun to reach the same stage as the naked embryo, it was observed that there was an acceleration of the development of the placed or uninjured embryo, following the quicker grooving of the naked embryo (Fig. 2). If we place such an embryo in for a few hours, i. e., after the final concentration of the ontogenin has been formed, then its development is ordinarily disturbed, especially if we use embryos of over-ripe eggs, which turn out to be more sensitive towards the ontogenins (Fig. 2). We noticed a stimulating effect only with some ontogenins (3, 4, 10, 13, 14). It seems that the time of penetration of the ontogenin in the test embryo is of importance. If, for instance, the latter stays in ontogenin 3 only 15 min and after that we take it out and place it under ordinary conditions, its development is not disturbed.

The specificity of the action of the ontogenins make us think that the ontogenins represent normal specific products of a biochemical chain-process of growth. Introducing them into the embryo at the moment of their formation, we specifically stimulate the growth. On the other hand, introduction of an extreme, determining concentration into the embryos metabolism before normal and gradual formation, they cause disorders and death. This view is supported by the results of my last experiment. We homogenized the embryos exactly at the moment of development when they can separate ontogenins. We obtained dyalizable substances with the action similar to the ontogenines, which stop the development of younger embryos; older embryos develop unhindered. If the homogenized embryo is of a more advanced stage of development, the placed embryos with vitelline membrane develop normally at the beginning, after which they perish.

Text of the Remark Stage: I unfertilized egg, II gray crescent, III First cleavage, IV four cells, V eight cells, VI sixteen cells, VII 32 cells, VIII 64–256 blastomeres, VIIIa early blastula, IX middle blastula, IXa late blastula, X early gastrula, XI middle gastrula, XII late gastrula, XIII neural plate, XIV neural folds, XIVa late neural folds, XV neural folds fusing, XVI neural tube just formed.

Zusammenfassung

Der Verfasser nimmt an, dass durch Konglutination von Spermien mit Embryonen von *Triton cristatus* verschiedener Entwicklungsstadien morphogenetische Wirkstoffe entstehen, die je nach Stadium des verwendeten Embryos ganz verschiedene, aber spezifische Wirkungen haben. Es werden die wichtigsten morphogenetischen Prozesse wie Furchung, Morulabildung, Gastrulation und Neurulation selektiv beeinflusst. Diese Wirkstoffe, welche auch in der Normalentwicklung nacheinander entstehen und jedesmal die betreffende Entwicklungsphase einleiten sollen, werden als «Ontogenine» bezeichnet.

[9] G. K. Roussev, C. R. Acad. bulg. Sci. *5*, 415 (1957) (französisch).

STUDIORUM PROGRESSUS

Eine neue Umlagerung der Phenylalkane und ihre Beziehung zur Friedel-Crafts-Reaktion

Von C. D. Nenitzescu*

Wie schon seit langer Zeit bekannt[1], ist die Friedel-Crafts-Reaktion nicht selten von Umlagerungen begleitet. Diese können entweder vor der eigentlichen Substitution im Alkylierungsmittel oder im fertig gebildeten Phenylalkan stattfinden. Umlagerungen der ersten Art beruhen auf intramolekularen irreversiblen Hydridverschiebungen der intermediär auftretenden Carboniumionen, z. B. im Sinne primär → sekundär, primär → tertiär und sekundär → tertiär. Aus diesem Grunde entstehen häufig bei der Friedel-Crafts-Reaktion Gemische, in welchen das verzweigtere Phenylalkan um so reichlicher vertreten ist, je höher die Reaktionstemperatur war. Die Friedel-Crafts-Reaktion ist somit als eine kinetisch kontrollierte Reaktion aufzufassen, in welcher die ursprünglich entstandenen Carboniumionen teils unmittelbar, teils nach ihrer Umlagerung, von aromatischen Systemen abgefangen werden.

* Chemisches Institut der Akademie, Bukarest.

[1] Lit. bei C. C. Price, Organic Reactions *3*, 2 (1946).

Im Gegensatz dazu sind die durch Aluminiumchlorid bewirkten Umlagerungen der Phenylalkane offenbar thermodynamisch kontrollierte Reaktionen. Diese verlaufen gewöhnlich bei höherer Temperatur (80–100°C) und erfordern eine längere, für die Einstellung von Gleichgewichten hinreichende Zeit. Im Einklang damit sind diese (als Isomerisierungen und Disproportionierungen bezeichnete) intra- und intermolekularen Verschiebungen von Alkylgruppen ausschliesslich durch die Beständigkeiten der Ausgangsstoffe und der Endprodukte bedingt und von dem jeweiligen Reaktionsmechanismus unabhängig. Aus noch nicht vollkommen aufgeklärten Gründen wandern dabei primäre Alkylgruppen unverändert, ohne selbst eine Umlagerung zu erleiden[2–5].

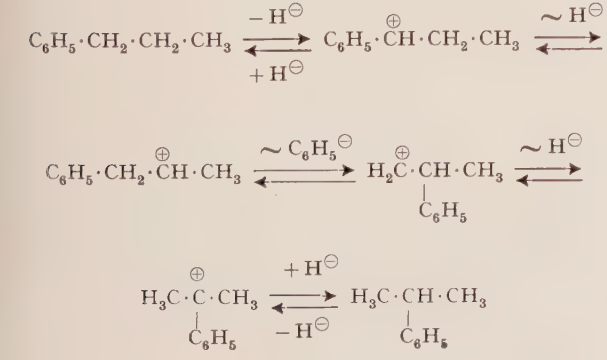
Wie vor kurzem beobachtet wurde[6], ist noch eine dritte Umlagerung bei der Friedel-Crafts-Reaktion möglich. Diese findet, neben den erwähnten Isomerisierungen und Disproportionierungen, unter der Einwirkung von feuchtem Aluminiumchlorid bei 80°, in der Seitenkette von Phenylalkanen statt. Den ersten Hinweis für das Vorkommen einer solchen Umlagerung lieferte eine von ROBERTS und BRANDENBERGER[7] beobachtete Isomerisierung von *n*-Propyl-β-^{14}C-benzol zum α-^{14}C-Isomeren. Neben diesen beiden Kohlenwasserstoffen mit normaler Seitenkette enthält das Reaktionsgemisch auch 3% Isopropylbenzol (mit noch unbestimmter Lage des markierten Kohlenstoffatoms). Dieser Befund wurde als ein Beweis für die Einstellung des folgenden Gleichgewichtes gedeutet[7]:

$$\underset{97\%}{C_6H_5\text{–}CH_2\text{–}CH_2\text{–}CH_3} \rightleftharpoons \underset{3\%}{CH_3\text{–}CH(C_6H_5)\text{–}CH_3}$$

Die Prüfung dieser Hypothese durch den Versuch, das Gleichgewicht von der Seite des Isopropylbenzols her zu erreichen, führte tatsächlich zu *n*-Propylbenzol[6], wenn auch infolge störender Nebenreaktionen in geringer Ausbeute.

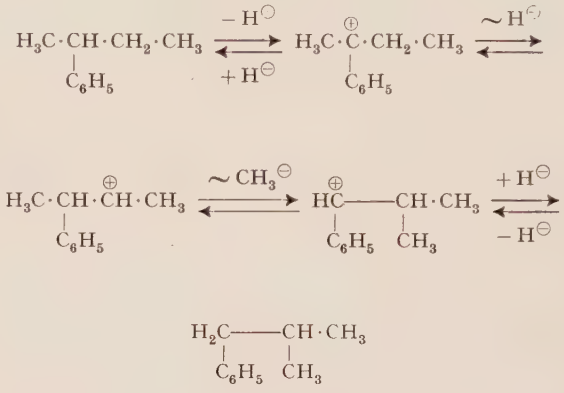
Es lag nahe, für die Umlagerung des Isopropylbenzols und anderer Phenylalkane einen ähnlichen Mechanismus wie für die Umlagerung der Alkane und Cycloalkane anzunehmen. Wie früher gezeigt[8], werden diese durch vollkommen wasserfreies Aluminiumchlorid nicht ausgelöst. Die aktivierende Wirkung des Wassers beruht wahrscheinlich auf der Bildung der komplexen Säure $H[AlCl_3OH]$, welche dem Alkan ein Hydridion zu entreissen vermag (der abgespaltene molekulare Wasserstoff konnte in einigen Fällen nachgewiesen werden[9]). Dass das Wasser auch für die Umlagerung der Phenylalkane förderlich ist, haben später ROBERTS *et al.*[10] nachgewiesen.

Auf die Umlagerung des *n*-Propylbenzols angewandt, führt diese Auffassung zum folgenden Schema:



Es wird angenommen, dass der erste Angriff am α-C-Atom erfolgt, weil das dabei entstehende Benzylkation durch Resonanz stabilisiert ist, und dass nur 1.2-Verschiebungen von H-, CH_3- und C_6H_5-Gruppen, nach dem Whitmoreschen Schema, stattfinden. Ob bei diesen Umlagerungen Phenoniumionen eine Rolle spielen, bleibe vorläufig dahingestellt.

Die bei den Propylbenzolen beobachtete Reaktion wurde auf höhere Phenylalkane ausgedehnt. Beim *sek.-Butylbenzol* entsteht, als einziges durch die angewandte analytische Methode[11] fassbares Produkt, *Isobutylbenzol*. Die Entstehung dieses Kohlenwasserstoffs kann auf eine Hydrid- und eine Methylverschiebung im intermediär auftretenden Carboniumion zurückgeführt werden.



Gleichzeitig und unabhängig haben ROBERTS *et al.*[10] mittels feinerer analytischer Methoden gezeigt, dass die Umlagerung des *sek.*-Butylbenzols zu Isobutylbenzol (mit $AlCl_3$, bei 100°) zu einem Gemisch dieser beiden Kohlenwasserstoffe, im Verhältnis 1:2, führt.

In der Reihe der *Amylbenzole* wurde zuerst die ausserordentlich leicht verlaufende Umlagerung des *tert.-Amylbenzols* in *2-Methyl-3-phenyl-butan* (1 h bei 80°) nachgewiesen:

[2] G. BADDELEY und J. KENNER, J. chem. Soc. (London) *1935*, 303.

[3] D. A. MCCAULAY und A. P. LIEN, J. Amer. chem. Soc. *75*, 2411 (1953).

[4] R. E. KINNEY und L. A. HAMILTON, J. Amer. chem. Soc. *76*, 786 (1954).

[5] D. NIGHTINGALE und J. M. SHACKELFORD, J. Amer. chem. Soc. *76*, 5767 (1954); *78*, 1225 (1956).

[6] C. D. NENITZESCU, I. NECŞOIU, A. GLATZ und M. ZALMAN, Chem. Ber. *92*, 10 (1959).

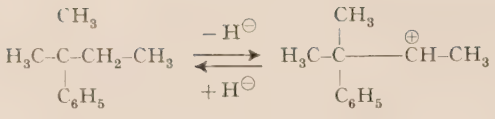
[7] R. M. ROBERTS und S. G. BRANDENBERGER, J. Amer. chem.Soc. *79*, 5484 (1957).

[8] C. D. NENITZESCU und I. CANTUNIARI, Ber. dtsch. chem. Ges. *66*, 1097 (1933).

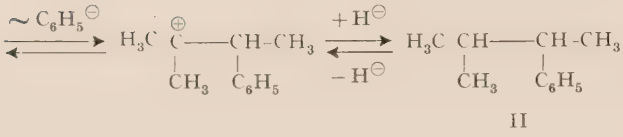
[9] C. D. NENITZESCU, M. AVRAM und E. SLIAM, Bull. Soc. chim. France *1955*, 1266.

[10] R. M. ROBERTS, Y. W. HAN, C. H. SCHMID und D. A. DAVIS, J. Amer. chem. Soc. (im Druck). Für die freundliche Überlassung des Manuskripts vor der Veröffentlichung möchte ich Herrn Prof. ROBERTS herzlichst danken.

[11] Umwandlung in die Bis-acetamino-Derivate nach V. N. IPATIEFF und L. SCHMERLING, J. Amer. chem. Soc. *59*, 1056 (1937); *60*, 1476 (1938); *65*, 2470 (1943).

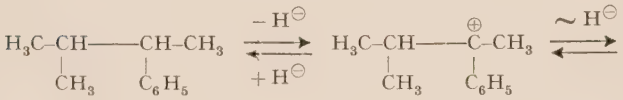


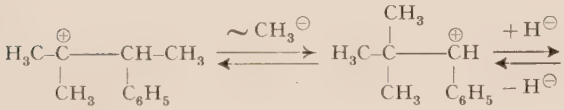
I

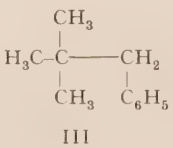


II

Wird das so gewonnene (oder synthetisches) 2-Methyl-3-phenyl-butan weitere 24 h mit Aluminiumchlorid auf 80°C erwärmt, so kann eine Amylbenzol-Fraktion isoliert werden, welche überwiegend aus 1-Phenyl-2.2-dimethyl-propan (Neopentylbenzol) besteht:







III

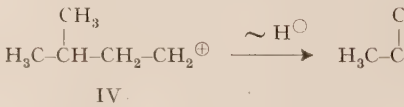
Merkwürdigerweise zeichnen sich die Endprodukte dieser Umlagerungen, das *n*-Propylbenzol, das Isobutylbenzol und das Neopentylbenzol, dadurch aus, dass die Seitenketten mit einer CH_2-Gruppe am Benzolkern anhaften. Bei der Umlagerung des einzigen bis jetzt untersuchten Phenylalkans mit tertiärer Phenylgruppe, des *tert.*-Amylbenzols, wandert diese Gruppe zum benachbarten sekundären Kohlenstoffatom. Da es sich um eine thermodynamisch kontrollierte, zu einem Gleichgewicht führende Reaktion handelt, darf man schliessen, dass die Stabilität der isomeren Phenylalkane, umgekehrt wie bei der Friedel-Crafts-Alkylierungsreaktion, in der Reihenfolge prim. > sek. > tert. zunimmt.

Diese Beobachtung mag vielleicht eine Erklärung für die schon erwähnte Tatsache bieten, dass bei den Isomerisierungen und Disproportionierungen der höheren Phenylalkane die primären Seitenketten *ohne Isomerisierung* wandern. Da diese Umsetzungen unter den gleichen Bedingungen wie die Umlagerung der Phenylalkane verlaufen, ja sogar von diesen gar nicht zu scheiden sind, entstehen selbstverständlich dabei die gleichen Produkte und dies können nur die thermodynamisch stabilsten Isomeren der betreffenden Phenylalkane sein.

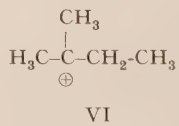
Gemeinsam mit Friedel-Crafts-Reaktion stattfindende Umlagerungen von Phenylalkanen. Je nach Alkylierungsmittel, Katalysator, Lösungsmittel und Temperatur, können bei der Einführung höherer Alkylgruppen am Benzolkern in nicht voraussehbarer Weise[1] verschiedene Reaktionsprodukte entstehen. Die meisten, vielleicht sogar alle anomal oder widersprechend scheinenden Umsetzungen dieser Art lassen sich zwanglos deuten, wenn zwischen den Umlagerungen die am Alkylierungsmittel vor seiner Bindung an den Benzolkern und den Umlagerungen, welche nachträglich am fertigen Phenylalkan vor sich gehen, unterschieden wird.

Dies sei an Hand einiger Beispiele, welche sich auf die Einführung des Pentylrestes in Benzol beziehen, erläutert. Aus der Tabelle geht hervor, dass je nach Reaktionsbedingungen, *tert.*-Amylbenzol, 2-Methyl-3-phenyl-butan oder Neopentylbenzol entstehen. Unter der katalytischen Wirkung von Schwefelsäure, Fluorwasserstoff, Eisen(III)-chlorid und Aluminiumchlorid in Nitromethan entsteht nur *tert. Amylbenzol* (Versuche 1, 2, 3, 5, 8, 9); in Gegenwart von reinem Aluminiumchlorid bildet sich aber ausschliesslich oder vorwiegend *2-Methyl-3-phenyl-butan* (Versuche 4, 6 und 7). Das reine (feuchte) Aluminiumchlorid wirkt also anders als Fluorwasserstoff oder Schwefelsäure und auch anders als das an Nitromethan komplexgebundene Aluminiumchlorid.

Die Natur des Alkylierungsmittels übt offenbar im Gegensatz zum Katalysator nur einen geringen Einfluss aus, ebenso die Temperatur (s. jedoch weiter unten). Nach einer älteren Auffassung[12] soll Schwefelsäure ein stärkerer Katalysator sein als Aluminiumchlorid, weil z. B. die Alkylierung des Benzols mit Isopropyläthylen bei Gegenwart von Schwefelsäure *mit* Umlagerung, bei Gegenwart von Aluminiumchlorid dagegen (scheinbar) *ohne* Umlagerung stattfindet (Versuche 3 und 4). Plausibler ist folgende Deutung: Die angewandten Alkylierungsmittel bilden zuerst eines der folgenden drei Carboniumionen (IV, V, VI). Die Ionen IV und V gehen, wie schon besprochen, unter intramolekularer Hydridverschiebung in das stabilere tertiäre Carboniumion VI über.



IV V



VI

Das Carboniumion VI allein reagiert mit Benzol weiter[13], da bekanntlich tertiäre Alkylierungsmittel bedeutend schneller reagieren als sekundäre oder primäre[14]. Das zuerst entstehende Alkylierungsprodukt ist also in allen Fällen *tert.*-Amylbenzol. Dieses wird von den meisten Alkalierungskatalysatoren auch bei höherer Temperatur nicht verändert (s. Versuch 8 und 9). Nur das Aluminiumchlorid ist befähigt, die Isomerisierung I → II oder II → III bei Phenylalkanen zu bewirken, da es allein die komplexe Säure $H[AlCl_3OH]$ erzeugen und molekularen Wasserstoff abspalten kann.

[12] V. N. Ipatieff, H. Pines und L. Schmerling, J. org. Chem. 5, 253 (1940).

[13] Ob das in den Versuchen 6 und 7 entstandene 2-Methyl-3-phenylbutan direkt durch Umsetzung von V mit Benzol oder via *tert.*-Amylbenzol entsteht, ist auf Grund der vorhandenen Versuche nicht zu entscheiden, doch ist die zweite Möglichkeit wohl die wahrscheinlichere.

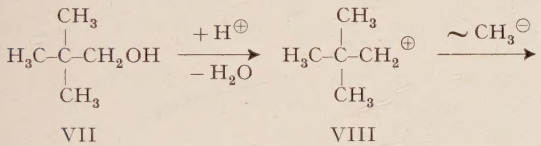
[14] H. C. Brown und H. Jungk, J. Amer. chem. Soc. 78, 2182 (1956).

Reaktionsprodukte bei der Alkylierung von Benzol in Abhängigkeit von den angewandten Reaktionsbedingungen

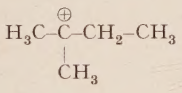
Versuch	Alkylierungsmittel	Katalysator	Temperatur	Reaktionsprodukt	Literatur
1.	Trimethyl-äthylen	H_2SO_4 (96proz.)	5°	I	15
2.	Trimethyl-äthylen	HF	0°	I	16
3.	Isopropyl-äthylen	H_2SO_4 (96proz.)	5°	I	12
4.	Isopropyl-äthylen	$AlCl_3$	5°	II	12
5.	*tert.*-Amylchlorid	$FeCl_3$ $AlCl_3 . CH_3NO_2$ HF	20°	I	17
6.	*tert.*-Amylchlorid	$AlCl_3$	0°	85% II 15% I	17
7.	Isoamylbromid	$AlCl_3$	0°	85% II 15% I	17
8.	Isoamylalkohol	H_2SO_4 (80proz.)	65°	I	12
9.	Isoamyläther	BF_3	150°	I	18
10.	Neopentylalkohol	H_2SO_4 (80proz.)	65°	I	19
11.	Neopentylchlorid	$AlCl_3$	0°	II	19
12.	Neopentylalkohol	$AlCl_3$	80°	III	19

I *tert.*-Amylbenzol II 2-Methyl-3-phenyl-butan III Neopentylbenzol

Auf Grund dieser Vorstellung lassen sich auch die Verhältnisse bei der Alkylierung des Benzols mit Neopentylderivaten aufklären. Mit Neopentylalkohol (VII) und Schwefelsäure als Katalysator entsteht nur *tert.*-Amylbenzol (Versuch 10). Dies setzt das intermediäre Auftreten des tertiären Amylkations VI voraus, welches nur aus dem primär entstehenden Neopentylkation (VIII), nach dem Whitmoreschen Schema, entstehen kann:



VII VIII



IV

Werden dagegen Neopentylchlorid als Alkylierungsmittel und Aluminiumchlorid als Katalysator bei 0°C angewandt (Versuch 11), so entsteht 2-Methyl-3-phenylbutan. Sehr wahrscheinlich werden auch in diesem Fall dieselben Reaktionsstufen durchlaufen wie im Versuch 10, es kommt aber nachträglich eine Umlagerung noch hinzu.

Bei der entsprechenden Alkylierung des Benzols mit Neopentylalkohol und Aluminiumchlorid (Versuch 12) entsteht Neopentylbenzol. Es wurde früher angenommen, dass in diesem Falle die Umsetzung ohne Isomerisierung des Alkylierungsmittels stattfindet[20], doch führt die Reaktion mit grosser Wahrscheinlichkeit über sämtliche Stufen des Versuchs 11, denen sich noch eine Umlagerung 2-Methyl-3-phenyl-butan-Neopentylbenzol anschliesst. Letztere ist, wie experimentell bewiesen[6], nur bei höherer Temperatur (80°C) und in Gegenwart von $AlCl_3$ möglich[21].

Bei der Einführung von Hexylgruppen in den Benzolkern werden ähnliche Verhältnisse angetroffen wie bei der Einführung von Pentylgruppen[15].

Zur Erklärung der Entstehung von «anomalen» Produkten bei der Friedel-Crafts-Alkylierungsreaktion wird gewöhnlich eine Umlagerung im Alkylierungsmittel, meistens vor der Anlagerung desselben an den Benzolkern[22], seltener gleichzeitig[15] mit dieser Reaktion («a concerted molecular nucleophilic displacement reaction») angenommen. Schmerling und West[15] schlagen auch einen dem hier vertretenen sehr ähnlichen Mechanismus vor, welcher sich jedoch von diesem in einem wesentlichen Punkt unterscheidet, nämlich dadurch, dass zur Entstehung der Phenylalkyl-Kationen die Gegenwart tertiärer Carboniumionen für notwendig gehalten wird. Letztere sollen aus den als Alkylierungsmittel verwendeten Alkylhalogeniden im Verlaufe der Friedel-Crafts-Reaktion entstehen und zum Abfangen der von den Phenylalkanen abgegebenen Hydridionen dienen. Eine von der Friedel-Crafts-Reaktion unabhängige Umlagerung der Seitenkette der Phenylalkane scheint noch nicht in Erwägung gezogen worden zu sein.

[15] V. N. Ipatieff, H. Pines und L. Schmerling, J. Amer. chem. Soc. *60*, 353 (1938).

[16] J. H. Simons und S. Archer, J. Amer. chem. Soc. *60*, 2952 (1938).

[17] L. Schmerling und J. P. West, J. Amer. chem. Soc. *76*, 1917 (1954).

[18] M. J. O'Connor und F. J. Sowa, J. Amer. chem. Soc. *60*, 125 (1938).

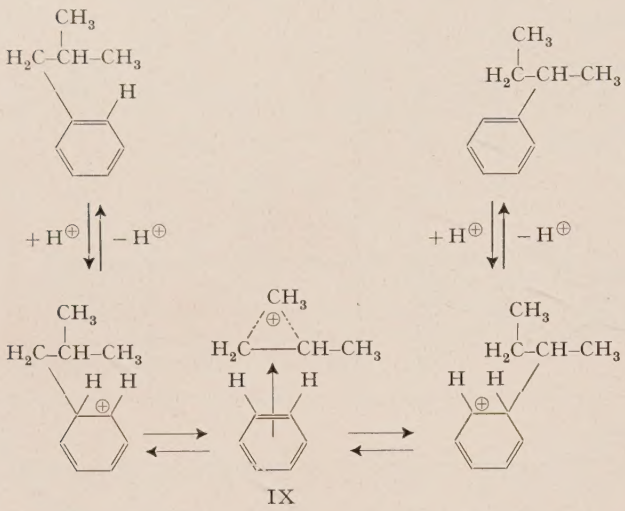
[19] H. Pines, L. Schmerling und V. N. Ipatieff, J. Amer. chem. Soc. *62*, 2901 (1940).

[20] L. Schmerling und J. P. West, J. Amer. chem. Soc. *76*, 1920 (1954).

[21] Dass sich auch andere primäre Alkohole mit Benzol in Gegenwart von $AlCl_3$ *ohne* wahrnehmbare Isomerisierung kondensieren[1] (S. 8), ist wahrscheinlich auf eine ähnliche Folge von Umlagerungen zurückzuführen. Die Alkylierung mit Alkoholen erfordert wegen der geringeren Ionisierungstendenz der C–O-Bindung höhere Temperatur und einen Überschuss an $AlCl_3$, was die Umlagerung begünstigt. S. auch I. P. Tsukerwanik, *Untersuchungen auf dem Gebiete der Alkylierung des aromatischen Kerns* (Univ. Verlag, Erevan 1955 [russ.]).

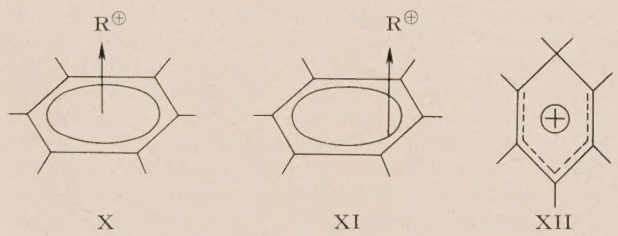
[22] G. Baddeley, Quart. Rev. *8*, 365 (1954).

Nach Roberts *et al.* [7,10,23] findet die Umlagerung der Phenylalkane, zum Beispiel der Butylbenzole, in der Seitenkette statt, und zwar in intermediär auftretenden überbrückten π-Komplexen, wie etwa IX.



IX

Von den beiden Arten von π-Komplexen, die einen mit zentraler Stellung (X), die anderen mit lokalisierter Stellung des elektrophilen Addendums $R^{\oplus}$ (XI), sind erstere als Zwischenprodukte bei der aromatischen Substitution sowohl aus theoretischen [24], als auch aus experimentellen Gründen [25] unwahrscheinlich.



X XI XII

Ob lokalisierte π-Komplexe (XI) bei der aromatischen Substitution eine Rolle spielen und ob überhaupt ein Unterschied zwischen solchen π-Komplexen und den bei der aromatischen Substitution auftretenden σ-Komplexen (XII) besteht, ist heute schwer zu entscheiden [24,25]. Sollten aber lokalisierte π-Komplexe (XI) als Zwischenprodukte bei der Umlagerung der Phenylalkane tatsächlich auftreten, so müssten diese in jeder Beziehung mit den bei der Friedel-Crafts-Alkylierungsreaktion als Zwischenprodukte angenommenen π-Komplexen [26] identisch sein. Bei Identität der Zwischenprodukte ist aber auch Identität der Endprodukte zu erwarten. Da dies, wie oben gezeigt wurde, nicht der Fall ist, muss wohl die Hypothese des Auftretens von π-Komplexen sowohl bei der Umlagerung der Phenylalkane als auch bei Friedel-Crafts-Reaktionen aufgegeben werden.

Eine brauchbare Theorie der neuen Umlagerung der Phenylalkane muss ferner die beobachteten Unterschiede in der Wirkungsweise der einzelnen Friedel-Crafts-Katalysatoren erklären können. Diese Forderung ist bei dem hier vorgeschlagenen Mechanismus erfüllt. Zu erforschen wäre noch die von dieser Theorie vorauszusehende, aber durch gewöhnliche analytische Methoden nicht nachweisbare Entstehung molekularen Wasserstoffs in der Initialstufe.

Summary

In the course of various methods of Friedel-Crafts alkylation reactions, isomerizations are taking place which could only partly be explained by existing theories. On the basis of a newly discovered rearrangement of phenylalkanes, a large part of the hitherto described 'anomalous' reactions may be explained. Possible mechanisms for these rearrangements are discussed.

[23] R. M. Roberts, S. G. Brandenberger und S. G. Panayides, J. Amer. chem. Soc. *80*, 2507 (1958).

[24] L. Melander, Arkiv Kemi *2*, 211 (1950).

[25] W. von E. Doering, M. Saunders, H. G. Boyton, H. W. Earhart, E. F. Wadley, W. R. Edwards und G. Laber, Tetrahedron *4*, 178 (1958).

[26] H. C. Brown und H. Jungk, J. Amer. chem. Soc. *77*, 5579 (1955). – H. C. Brown und Ch. R. Smoot, J. Amer. chem. Soc. *78*, 2176 (1956).

CONGRESSUS

SWEDEN

First International Pharmacological Meeting

Stockholm, August 22–25, 1961

Under the auspices of the Section on Pharmacology of the International Union of Physiological Sciences.

Symposia on 'Mode of action of drugs' with participation of leading biochemists, pharmacologists and physiologists.

Program designed to promote attendance by members of the International Union of Biochemistry visiting the Fifth International Congress of Biochemistry.

For all inquiries please write to the Secretariat of the First International Pharmacological Meeting. Secretary General, Dr. Arvid Wretlind, Karolinska Institutet, Stockholm 60, Sweden.

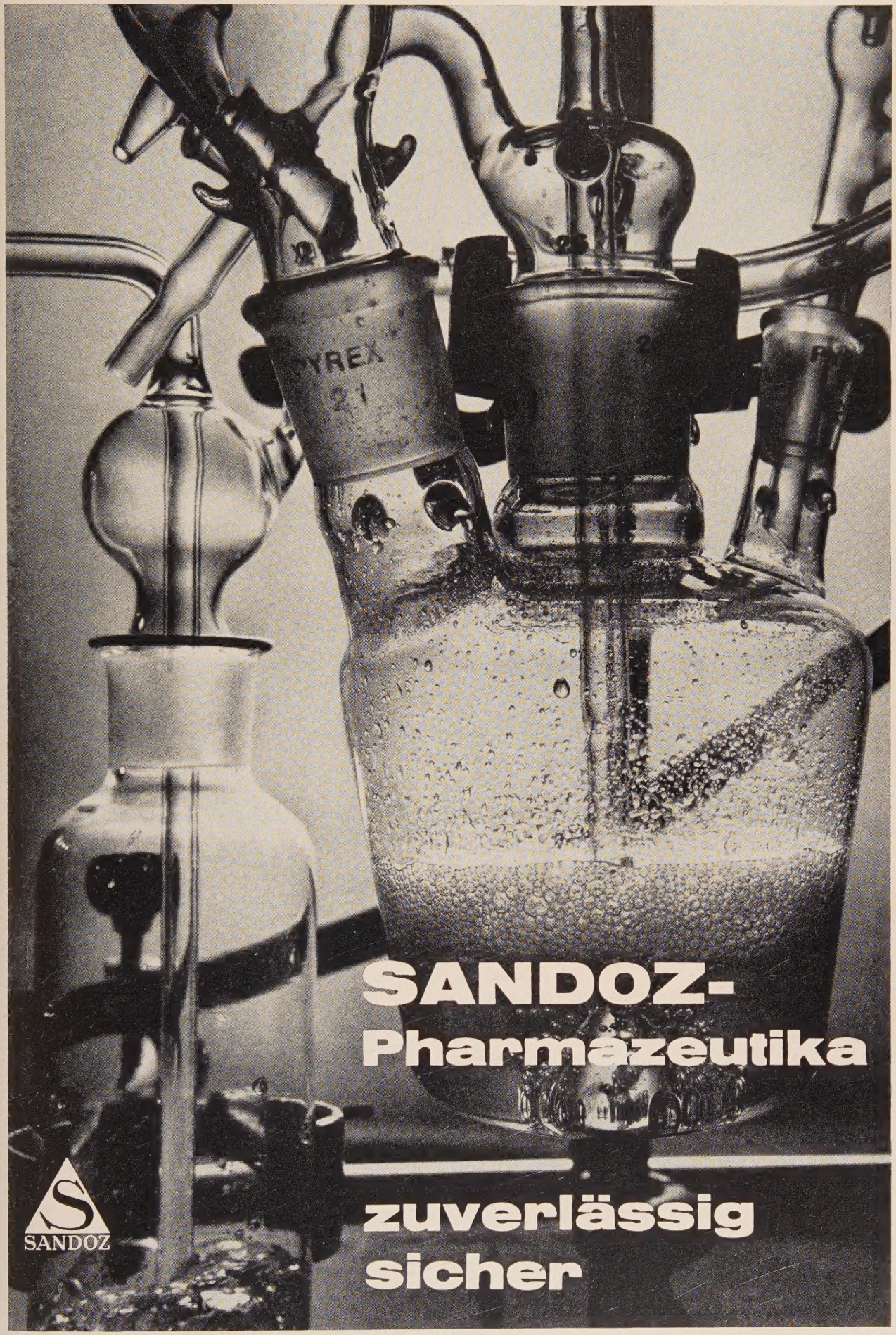
SWEDEN

International Congress on Biophysics

Stockholm, July 31 to August 4, 1961

An International Congress on Biophysics will be held in Stockholm from July 31 to August 4, 1961. The purpose of the meeting is to provide a forum for international communication in the field of biophysics. Participants may include members of national societies of biophysics, medical physics, and related fields, and other scientists interested in pure and applied biophysics. The meeting will be divided between a series of symposia devoted to special topics in biophysics and to presentations of a number of contributed papers in pure and applied biophysics submitted by the participants.

Further information can be obtained from Dr. Bo Lindström at the Department of Medical Physics, Karolinska Institutet, Stockholm 60, Sweden.


PYREX
SANDOZ-
Pharmazeutika
zuverlässig
sicher
SANDOZ

Significant biochemicals

from **REGIS...**

Kynuramine Dihydrobromide
Monamine oxidase standard.

5-Benzyloxyindole
Intermediate to 5-Hydroxyindoles.

DL 5-Hydroxytryptophan
Metabolic precursor to Serotonin.

5-Methoxyindole
Intermediate to Melatonin.

N,N-Dimethyltryptamine
New psychogenic agent.

Catalog on Request.

REGIS CHEMICAL COMPANY

1219 N.Wells Street · Chicago 10, Illinois, USA

PHYSIOLOGIE DER INSEKTEN

von

Prof. Dr. *V. B. Wigglesworth*,
Professor an der Universität Cambridge (England)

Ins Deutsche übersetzt von Prof. Dr. *M. Lüscher*,
Professor an der Universität Bern.

2. Aufl. 832 Seiten, 355 Fig. Ganzleinen Fr. 32.– (1959).

Reihe der experimentellen Biologie, Band 14,
Sammlung «Lehrbücher und Monographien
aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften».

Inhalt: Die Entwicklung im Ei – Das Integument – Das Wachstum – Muskelsystem und Fortbewegung – Das Nervensystem – Sinnesorgane: Das Sehen – Sinnesorgane: Mechanische und chemische Reize – Das Verhalten – Die Atmung – Das Zirkulationssystem und damit in Verbindung stehende Gewebe – Ernährung und Verdauung – Ausscheidungen – Metabolismus – Wasser und Temperatur – Fortpflanzung – Namen und Sachverzeichnis.

«Da das Gebiet der Insektenphysiologie weit über den Kreis der vergleichenden Physiologen vor allem von eminenter praktischer Bedeutung ist, erscheint eine Übersetzung gerechtfertigt, zumal es in deutscher Sprache nichts Vergleichbares gibt.» (H. Autrum, *Berichte über die gesamte Biologie*).

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung – Obtainable from your bookseller – Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL/STUTTGART

LE ROY

Statistische Methoden der Populationsgenetik

Ein Grundriss für Genetiker, Agronomen und Biomathematiker

Von Prof. Dr. Henri Louis Le Roy, ausserordentlicher Professor für Biometrik und Populationsgenetik an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich. 391 Seiten mit 65 Figuren. Preis gebunden Fr. 67.50 (DM 67.50)

Reihe der experimentellen Biologie, Band 15
Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften»

Aus dem Inhalt: Die Merkmalsprägung – Die Gen- und Umwelteffekte als Korrelationsfaktoren – Die Varianzanalyse als Grundlage für die Schätzung der Gen- und Umweltwirkung – Die künstliche Selektion Literaturverzeichnis (mehrere Hundert Literaturangaben über theoretische und praktische Studien).

Über die rein technische Anleitung hinaus, wie statistische Methoden auf genetische Untersuchungen anzuwenden sind, werden die genetischen Hypothesen aufgezeigt, welche von Fall zu Fall in die verschiedenen statistischen Methoden eingebaut sind. Die klare Formulierung der Hypothese ist die Voraussetzung für die Wahl der richtigen statistischen Analyse. Umgekehrt gilt das Ergebnis einer numerischen Auswertung nur für die Hypothese, von der ausgegangen wurde. Für das Verständnis wird die Kenntnis der grundlegenden statistischen Analysenmethoden vorausgesetzt, wie sie z. B. von Linder (1951 und 1953) in seinen beiden Lehrbüchern sehr instruktiv dargestellt sind. In bezug auf die Genetik genügt die Kenntnis des Mendelismus.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung – Obtainable from your bookseller – Commandes à votre libraire.

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART